

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİMDALI

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE HEMOLİTİK ANEMİLİ
ÇOCUKLARDA GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ
GENİNDEKİ MUTASYONLARIN MİKROARRAY
SİSTEMİ İLE TESBİTİ**

Dt. Hasan DOĞAN

**Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Mevlit İKBAL**

**Doktora Tezi
ERZURUM 2007**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE HEMOLİTİK ANEMİLİ ÇOCUKLARDA
GLİKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ GENİNDEKİ MUTASYONLARIN
MİKROARRAY SİSTEMİ İLE TESBİTİ**

Dt. Hasan DOĞAN

Tezin enstitüye verildiği tarih : 05.09.2007

Tezin sözlü savunma tarihi : 17.09.2007

Tez danışmanı : Doç. Dr. Mevlit İKBAL

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fahri UÇAR

Jüri Üyesi : Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatih AKÇAY

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Adnan TEZEL

**Eylül 2007
ERZURUM**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	II
ÖZET	III
SUMMARY	IV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Anemi	3
2.2. Hemolitik Anemiler	6
2.3. Eritrositte Enerji	9
2.4. Pentoz Fosfat Yolu	11
2.5. Glutasyon Yolu	13
2.6. G6PD enzim eksikliği	17
2.7. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz	21
2.8. G6PD yetmezliğinin tanısı için uygulanan yöntemler	34
2.9. Mikroarray ile G6PD Gen Mutasyonlarının Tespiti	36
2.10. Çalışmanın Amacı	45
3. MATERYAL VE METOD	48
3.1.1. Araç ve gereçler	48
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	49
3.1.3. Kullanılan Solusyonlar ve Hazırlanması	49
3.2. Metod	52
4.BULGULAR	65
5.TARTIŞMA	74
6.KAYNAKLAR	80

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme ve Moleküler Tanı Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Bu alışma süresince her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgilerinden ve deneyimlerinden faydalandığım çok değerli hocalarım, tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Mevlit İKBAL'e ve bölüm başkanım Sayın Prof.Dr. İbrahim PİRİM'e ve bu tezin tamamlanmasında büyük emeği geçen hocalarım, Sayın Prof.Dr. Fatih AKÇAY'a, Sayın Prof.Dr. Cemal GÜNDOĞDU'ya ve Doç.Dr. Fahri UÇAR'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca katkılarından dolayı, hocalarım Sayın Doç.Dr. Ayhan TAŐTEKİN'e, Sayın Doç.Dr. Mustafa BÜYÜKAVCI'ya ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Abdülgani TATAR'a laboratuvar çalışmalarım esnasında her türlü yardım ve destek gördüğüm çalışma arkadaşlarım, Sayın Nilnur EYERCİ, G. Zişan ÖNCEL, Mehmet EZER, Melek ÖKSÜZ, Nuriye GİNİŐ, Fulya TEMEL, Nesime . BULUT ve Nuran YANIK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında destek ve teşvikini hiçbir zaman esirgemeyen eşime ve 3 yaşındaki oğlum Ertuğrul'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE HEMOLİTİK ANEMİLİ ÇOCUKLARDA GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ GENİNDEKİ MUTASYONLARIN MİKROARRAY SİSTEMİ İLE TESBİTİ

Çalışmamızın amacı, yeni doğan hemolitik anemi teşhisi konmuş hastalarda glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzim genindeki belirli ve yaygın 4 mutasyonu taramak ve bölgemizdeki dağılımını incelemektir.

Bu amaçla, yeni doğan ile 7 yaş arasında değişen, doğumda sarılık görülen, hemolitik anemi teşhisi konulan ve G6PD enzim aktiviteleri 4.00 U/grHb nin altında olan (21 kız, 39 erkek) 60 olgu mikroarray yöntemi ile mutasyon analizine alınmıştır.

Çalışmamızda Mediterranean, Seattle, San Antioco ve Union olmak üzere 4 G6PD mutasyon tipi taranmıştır. Olgulardan periferik kan alınarak DNA izole edilmiş, incelenecek bölgeler PCR ile çoğaltılmış ve mikroarray teknolojiyle SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotid Değişimi) analizi yapılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda, G6PD geninde 60 olgunun 4'ünde (%6.66) G6PD Mediterranean (563 C→T) mutasyonu tespit ettik. Bulduğumuz bu mutasyonlardan 2'si heterozigot, 2'si de hemizigot Mediterranean mutasyonlarıdır. Bulduğumuz mutasyonların tamamı (%100) Mediterranean mutasyonudur. Diğer 3 mutasyon tipine bölgemizde rastlanmamıştır.

SUMMARY

DETERMINATION of GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE (G6PD) GENE MUTATIONS by MICROARRAY SYSTEM in CHILDREN with HEMOLYTIC ANEMIA in EAST ANATOLIA REGION.

The aim of this study is to investigate the four mutations of the gene of G6PD (Glucose 6 phosphate dehydrogenase) in newborn patients with hemolytic anemia and to examine the mutation prevalence in the region.

The study is involved in 60 subject (21 girls, 39 boys) whose ages were between newborn and 7 years old. The mutations studied by microarray techniques in subjects covered the G6PD enzyme activity under 4.00 U/grHb.

In the present study, 4 G6PD mutation types named as Mediterranean, Seattle, San Antioco and Union were scanned. Peripheral blood was taken and DNA was isolated. The PCR was performed for the given mutations, and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analysis were made by microarray technology.

As the result of the analysis, we established Mediterranean (563 C→T) mutations in 4 (6.66%) of 60 subject in G6PD gene. As a conclusion all (100%) the mutations found in this study were Mediterranean type. The other 3 mutations were not present in our series.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eritrositlerin 120 gün olan normal yaşam sürelerini tamamlamadan yıkılması hemoliz olarak tanımlanır ve hemolize bağlı fonksiyon eksikliğinden dolayı da hemolitik anemi gelişir.

Eritrositler organizmanın yaşamı için Organizmanın ihtiyacı olan O_2 temini, CO_2 'nin uzaklaştırılması, kan pH'sının ayarlanması gibi oldukça hayati işlevlerde rol alırlar. Taşıdığı yüksek derişimdeki O_2 'ne bağlı reaksiyonlar sırasında süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi oksidatif hasara yol açan metabolitler oluşur. Oluşan bu reaktif türevler hücre için oldukça zararlıdır. Bazı ilaçlar, bakla ve enfeksiyon gibi oksidatif ajanlara karşı korunmada eritrositler redükte glutatyonlardan (GSH) yararlanır. GSH yolunun ko-faktörü olan NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) Pentoz Fosfat Yolundan (PFY) temin edilir. Glukoz-6 -fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi PFY'nun birinci basamağında bulunan kilit enzimdir. Bu enzimdeki herhangi bir fonksiyon kaybı NADPH oluşumunun durmasına neden olarak eritrositleri oksidatif hasarlara karşı savunmasız bırakır¹⁻⁷.

G6PD enzim eksikliğinde özellikle yeni doğanda sarılık ve belirli ilaçlara karşı hassasiyet artarken, bakla ve enfeksiyonlar hemolitik anemiye provake etmektedir⁸⁻¹⁰.

G6PD enzim eksikliğinde yeni doğanda, doğumdan sonraki ilk günlerde karaciğer fonksiyonlarındaki yetersizlik ve enzim eksikliği nedeniyle bilirübinin yeteri kadar hızlı metabolize edilemez ve yeni doğan sarılığı ortaya çıkar^{11,12}.

Dünyadaki en yaygın enzimopatilerden biri olma özelliğini gösteren G6PD enzim eksikliği, 400 milyon kişinin taşıdığı tahmin edilen, kalıtsal bir hastalıktır.

Enzimin, değişik özellikler gösteren 400`ün üzerinde varyantı ve yaklaşık 150 mutasyonu tespit edilmiştir¹³⁻¹⁶.

Tanımlanan 400 varyanttan Dünya`da ve Türkiye`de daha çok Akdeniz yöresinde en sık görülen tipi G6PD Mediterranean`dır (G6PD Akdeniz)¹⁷⁻¹⁹. Çalışmamızda Dünya`da özellikle Avrupa kıtasında en sık görülen 4 mutasyon taranmıştır. Bu yöntemi kullanma amacımız G6PD genindeki bu mutasyonları mikroarray teknolojisiyle yüksek güvenilirlikle moleküler düzeyde incelemek ve mutasyonların bölgemizdeki insidansını ortaya koymaktır. Öncelikle yeni doğan döneminde görülen ve sebebi belirlenemeyen hemolitik anemi olgularının etyolojisini araştırmak ve var ise G6PD mutasyonlarını tanımlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anemi

Anemi, hemoglobinin yaş ve cinse göre normal kabul edilen değerlerin altında olmasıdır. Anemi başlı başına bir hastalık grubunu oluşturduğu gibi diğer bir çok hastalığın klinik belirtilerinden birini de oluşturabilir. Gelişmekte olan ülkelerde görünüşte sağlıklı olan bireylerin birçoğu anemiktir. Hatta gelişmiş ülkelerde dahi, hastaneye gelen hastaların üçte birine yakın kısmı anemiktir.

Eritrositlerin ve hemoglobinin asıl fonksiyonu, akciğerlerden dokulara oksijen transportudur. Anemide, kanın oksijen taşıma kapasitesi azaldığından, dokulara gerekli oksijen miktarı da azalarak doku hipoksisi gelişir. Hipoksi sonucu, dokuların fonksiyonları bozulur; bundan dolayı aneminin belirtileri pek çok sistemde ortaya çıkar. Özellikle adele, kardiyovasküler sistem ve santral sinir sistemi belirtileri daha sık rastlanan bulgulardır.

Anemik hastalarda belirti ve bulgular, aneminin kendisine ve anemiye sebep olan bozukluklara bağlıdır.

Semptomlar; aneminin ağırlığına, tipine ve anemi nedeni olan bozukluklara göre kişiden kişiye farklıdır. Sıklıkla altta yatan nedene ait belirti ve bulguları daha hafif veya orta derecede olmakla beraber, anemi semptomları esas klinik tabloya hakimdir. Çabuk yorulma, halsizlik ve genel adale güçsüzlüğü aneminin en çok görülen ve en erken semptomlarıdır.

Solukluk, en sık görülen karakteristik bulgudur. Deri, tırnak yatakları, müköz membranlar ve konjunktivada görülebilir. Pernisiyöz anemide cilt, limon sarısı renğinde olabilir.

Egzersiz dispnesi (nefes darlığı) ve çarpıntı en sık rastlanan semptomlardır. Hastaların çoğunda dispne egzersiz veya emosyonla ortaya çıktığı halde aneminin ağır olduğu (Hemoglobin; 3 g/dl veya daha az) hallerde ve kalp yetmezliği olanlarda istirahat halinde de dispne vardır. Anemik hastalarda, kalpte üfürüm (murmur) hemen her zaman vardır ve aneminin ağırlığı ile şiddeti ve görülme sıklığı artar.

Anemiler için farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. En yaygın kullanılan sınıflandırmalar fizyolojik sınıflandırma ve eritrosit boyutlarına göre yapılan sınıflandırmadır. Tablo 1’de eritrosit hacimleri esas alınarak yapılan sınıflandırma verilmiştir²⁰.

Tablo 1: Eritrosit hacimlerine göre yapılan anemilerin sınıflandırılması²⁰.**A. Mikrositik anemiler**

- a. Demir eksikliği anemisi
- b. Kronik kurşun zehirlenmesi
- c. Talasemik sendromlar
- d. Sideroblastik anemiler
- e. Kronik enflamasyon
- f. Unstable hemoglobinopati'ler

B. Makrositik anemiler**1. Megaloblastik kemik iliği ile birlikte**

- a. Vitamin B12 eksikliğine bağlı anemiler
- b. Folik asit eksikliğine bağlı anemiler
- c. Herediter orotik asidüri
- d. B1 vitaminine cevap veren megaloblastik anemi

2. Megaloblastik değişiklik olmaksızın

- a. Aplastik anemi
- b. Diamond-Blackfan sendromu
- c. Hipotiroidizm
- d. Karaciğer hastalığı
- e. Kemik iliği infiltrasyonu
- f. Diseritropoetik anemi

C. Normositik anemiler**1. Konjenital hemolitik anemiler**

- a. Hemoglobinopati'ler
- b. Enzim defektleri
- c. Membran defektleri

2. Akkiz hemolitik anemiler

- a. Antikora bağlı anemiler
- b. Mikroanjiopatik hemolitik anemiler
- c. Enfeksiyona bağlı anemiler

3. Akut kan kaybı**4. Splenik göllenme****5. Kronik renal hastalık**

2.2. Hemolitik Anemiler

Hemoliz; eritrositlerin normal yaşam sürelerini tamamlamadan yıkılmasına denir. Hemolitik anemilerde normal koşullarda 120 gün olan eritrositlerin yaşam süresi kısalmıştır. Hemolitik anemiler eritrositlerin normal yaşam sürelerinin eritrosit dışı sebeplere veya eritrositlerin kendilerine ait yapısal bozukluklara bağlı olarak kılmasından kaynaklanır. Eritrositlerin erken yıkımında, kemik iliği eritrosit yapımını arttırarak cevap verir ve gerektiğinde eritrosit yapımı hızla artabilir.

Hemolitik olaylar, eritrositlerin travma ve eksternal toksinlerin etkileri gibi sebeplerle intravasküler hemolizle dolaşımında ve immünglobulin bağlanmış eritrositlerin dalak ve karaciğer makrofaj reseptörlerine bağlanmasıyla veya deforme eritrositlerin ekstravasküler hemolizle dalak ve karaciğerde parçalanmasıyla gerçekleşmektedir.

Hemolitik anemiler birçok şekilde sınıflandırılabilir. Klinik ve laboratuvar bulgularının ortaya çıkış sürecine göre akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir. Ancak, kronik anemilerde akut alevlenmeler olabileceği için bu sınıflandırma yetersizdir. Hemolitik anemilerin konjenital (doğumsal) ve edinsel olarak sınıflandırılması klinisyenin işini büyük oranda kolaylaştırır. Yaygın olarak kullanılan hemolitik anemilerin etyolojik ve patogenetik sınıflaması Tablo 2'de verilmiştir²¹.

Tablo 2: Hemolitik anemilerin etyolojik ve patogenetik sınıflaması²¹.**I. Kongenital Hemolitik Anemiler**

- A. Eritrosit membran defektleri
1. Herediter sferositoz
 2. Herediter eliptositoz
 3. Herediter stomatositoz
- B. Eritrosit glikolitik enzimlerinin Eksikliği
(Emden-Meyerhof yolu)
1. Piruvat kinaz eksikliği
 2. Hegzokinaz eksikliği
- C. Eritrosit nükleotid metabolizma bozuklukları
1. Pirimidin 5'-nükleotidaz eksikliği
- D. Pentoz fosfat yolu ve glutatyon metabolizması enzim eksiklikleri
1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrojenaz
 2. Glutamin-sistein sentetaz
- E. Globin yapısı ve sentezindeki defektler
1. Orak hücreli anemi
 2. Diğer hemoglobinopatiler
 3. Talasemialar
 4. Hemoglobin S hastalığı

II. Edinilmiş Hemolitik Anemiler

- A. İmmunohemolitik anemiler
1. Uyumsuz kan transfüzyonu
 2. Yeni doğanın hemolitik hastalığı
 3. Otoimmün hemolitik anemiler
- B. Travmatik veya mikroanjiopatik hemolitik anemiler
1. Kardiyak hastalıklar
 2. Hemolitik üremik sendrom
 3. Greft rejeksiyonu,
- C. İnfeksiyöz ajanlar
1. Protozoa
 2. Bakteri
- D. Kimyasal maddeler ve ilaçlar
1. Oksidan ilaçlar ve kimyasal maddeler
 2. Non-oksidan ilaçlar ve kimyasal maddeler
- E. Fizik ajanlar (ısı)
- F. Hipofosfatemi
- G. Karaciğer hastalığı (spur cell anemi)
- H. Yeni doğan E vitamini eksikliği

Yeni doğanda Hemolitik Anemilerin Ayırıcı Tanısı

Hemoliz nedeni ile gelişen anemiler yeni doğan döneminde sık görülür ve bir çok nedene bağlıdır. Genel olarak hemoliz doğumdan sonraki 1. haftada sarılığın nedeni araştırılırken saptanır. Yeni doğanlarda hemolitik hastalığın tanısı güçtür ve tanısall testlerin kullanımı sınırlıdır.

Yeni doğanlarda hemolitik hastalığın bir çok belirtisi vardır¹². Bunlar:

1. Eritrositlerin retiküloendotelyal sistemde yıkılması ile bilirubin açığa çıkar ve kanda indirekt bilirubin ve total bilirubin miktarı artar.
2. İlk 24 saatte ortaya çıkan sarılık hemolitik anemiye düşündürür.
3. İndirekt bilirubinde artış görülen yeni doğanlar hemolitik anemi açısından değerlendirilmelidir.
4. Kanama olmamasına rağmen hemoglobin konsantrasyonunda hızlı düşüş görülür.
5. Hemoglobin konsantrasyonundan bağımsız artmış eritrosit üretimi (retikülositoz).
6. Eritrosit morfoloji değişiklikleri görülür.
7. Hemoglobinüri ve yükselmiş karboksihemoglobin düzeyi vardır.

Hemolitik Anemilerde Laboratuvar Bulguları

Hemolitik anemideki laboratuvar testleri kendi içerisinde üç gruba ayrılabilir:

1. Eritrosit yıkımındaki artışla ilgili olanlar,
 - Eritrosit yaşam süresi kısalmır.
 - Hem katabolizması (Hiperbilirubinemi) vardır.
 - Hemoglobinemi, hemoglobinüri görülür.
 - Laktat dehidrojenaz (LDH) serumda artar.
 - Haptoglobulin azalmır.

2. Eritrosit yapımındaki artışla ilgili olanlar

- Kemik iliği hiperplazisi
- Retikülozis
- Demir turn-over'inin artışı

3. Ayırıcı tanıda yararlı olabilen testler.

- Coomb's testi (antiglobulin test)
- İndirekt coomb's testi

2.3. Eritrositte Enerji

Eritrositlerin temel görevi akciğerlerden dokulara oksijen ve dokulardan akciğerlere karbondioksit taşımaktır. Bu işlev hemoglobindeki demirin iki değerli halde olması, hücre içi elektrolit düzeyinin dengede tutulması ve hücrenin bikonkav biçiminin korunmasıyla gerçekleştirilir. Eritrositlerin bu işlevi yerine getirmesi için enerjiye gereksinimi vardır. Enerjinin kullanımı çok sayıda enzimle gerçekleştirilir. Eritrositlerdeki enzimler kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerde ve az miktarda retikülositlerde oluşturulur. Eritrositler dolaşıma salınmadan 1-2 gün önce çekirdeğini kaybeder ve artık yeni enzim sentezi gerçekleştirilemez. Eritrositlerin tek enerji kaynağı insülininden bağımsız taşınan glukozdur.

Eritrositlerin başlıca metabolik yakıtı glukozdur. Glukoz, eritrositlerde glikoliz yolunda laktata kadar metabolize edilir veya pentoz fosfat yolunda okside edilir.

Enerji kaynağı olarak günlük alınan glukozun büyük bir kısmını kullanan beyin ile mitokondrileri olmadığı için glukozdan başka enerji kaynağı kullanma şansı olmayan eritrositler için karbonhidratların önemi daha fazladır.

Karbonhidrat metabolizması, temelde birkaç enzimatik reaksiyon dizisinden ibarettir. Bu reaksiyon dizilerinin tamamı glukozu yöneliktir. Glukozun bu yolları işletebilmesi için hücre içine transportundan hemen sonra glikofosfatlara (Aktif glukoz, glukoz 6-fosfat) çevrilmesi gerekir. Glikoliz hücrenin sitoplazmasında altı karbonlu glukozun, on basamakta iki molekül üç karbonlu piruvata yıkılması olayıdır. Anaerobik koşullarda piruvattan laktat oluşur. Glikolize uğrayan her glukoz molekülü için net 2 molekül ATP oluşmaktadır. Laktat oluşumundan sonra O_2 varlığında aerobik glikoliz yolu işler ve mitekondrideki sitrik asit döngüsüyle net 38 ATP enerji elde edilir.

Anaerobik glikoliz, oksijenin hiç olmadığı veya yeterli olmaması durumlarında işleyen bir yoldur. Eritrositler, O_2 'i taşırlar, fakat metabolizmalarında kullanamazlar. Glukozdan enerji elde edilmesi ve kullanımı için gerekli enzimler, nükleus ve mitokondri olmadığı için dolaşımdaki eritrositlerde yeniden sentezlenemezler ve 120 gün içinde yavaş yavaş yıkılırlar. Glukozun glikoliz yolunda yıkılması sırasında piruvat oluşur. Ancak eritrositlerde mitokondrial sistemler bulunmadığından piruvat, sitrat döngüsünde metabolize edilemez, laktik aside dönüşür. Eritrositlerde glukozun glikoliz yolunda laktata yıkılması sırasında 2 ATP tüketilmekte ve 4 ATP oluşmaktadır ki böylece net kazanç 2 ATP olmaktadır. Glikolizle oluşan ATP, ATPaz'ların iyon pompalama işlevleri için kullanılır. Eritrosit hücresinin temel görevi dokulara O_2 bırakarak CO_2 almaktır. O_2 'in eritrositlere bağlanması, transportu ve bırakılması, metabolik olarak enerji harcanmasını gerektirmez.

Eritrositlerdeki anaerobik glikolitik yol, aynı zamanda NADH sağlar. Glikolizde gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz tarafından oluşturulan NADH, methemoglobindeki Fe^{+3} 'ün methemoglobin redüktaz tarafından Fe^{+2} şekline indirgenmesinde kullanılır. Methemoglobin hemoglobinin oksijene bağlanması ve salıverilmesi sırasında

hemoglobin yapısındaki 2 değerlikli demirin 3 değerlikli demire yükseltgenmesiyle oluşur.

2.4. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu alyuvarlar ve beyin doku hücreleri gibi bazı hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için başvurulan glikolize alternatif bir oksidatif yoldur. Eritrosit içine giren glukozun %90'ı glikolitik yolla okside olurken, %10'luk bir kısmı ise pentoz fosfat yolu ile metabolize edilir²².

Pentoz fosfat yolunda indirgeyici biyosentez reaksiyonları için gerekli NADPH'lar üretilmektedir. Olgun eritrositlerin biyosentez yeteneğinin olmaması nedeniyle pentoz fosfat yolunun eritrositler için önemi indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerini dengede tutabilmek için gerekli NADPH'ların elde edilmesidir. GSH'nin görevi ekzojen ve endojen kaynaklı peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı eritrositleri korumaktadır.

Heksoz monofosfat yolu da denen bu yolun temel görevi, eritrositlerin savunma sisteminde kullanılan NADPH'nin üretilmesidir. Üretilen NADPH'lar genel olarak; İndirgenmiş glutatyon, steroidler, bazı amino asitler, yağ asitlerinin sentezi ve DNA sentezi için ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüşmesi gibi birçok reaksiyonda kullanılırlar.^{3,19,23,24}

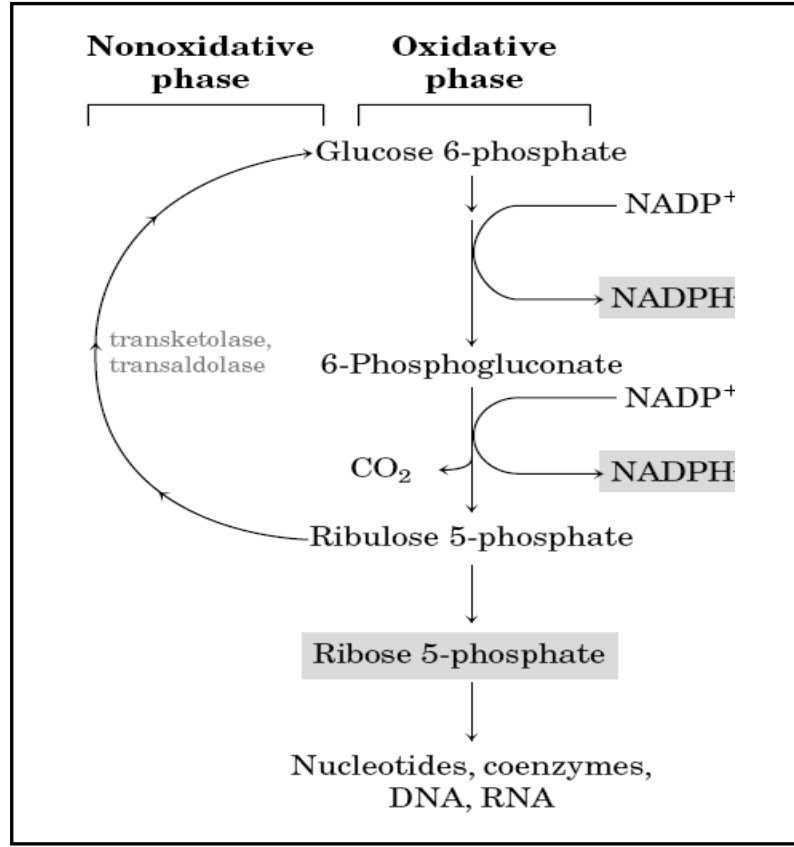
Pentoz fosfat yolu, glukoz 6-fosfatın 1 nolu karbonunun dehidrogenasyonu ile başlar. Bu reaksiyon glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Reaksiyonun ürünü 6-fosfoglukono- δ -laktondur. Bir sonraki basamak 6-fosfoglukono δ -laktunun laktonaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonata hidrolizidir. 6 karbonlu şeker daha sonra oksidatif dekarboksilasyonla ribuloz 5-fosfata dönüşür.

Oluşan bu 5 karbonlu şeker ve türevleri ATP, CoA, NAD⁺, FAD, RNA ve DNA gibi hücre için hayati öneme sahip biyomoleküllerin yapısına girerler. Bu reaksiyonda koenzimi NADP⁺ olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi görev alır. Pentoz fosfat yolu reaksiyonları sonucu bir glukoz molekülü başına iki NADPH ve bir riboz 5-fosfat meydana gelmektedir. Pentoz fosfat yolunda oksidatif reaksiyonla glukoz 6-fosfat riboz 5- fosfata oksitlenirken toplam 2 NADPH üretilir^{2,23}.

Bu olayın toplam reaksiyonu;

“Glukoz 6 fosfat + 2NADP —> Riboz 5-fosfat + 2NADPH + 2H + CO₂”dir.

Pentoz fosfat yolunda oksidatif ve non-oksidatif faz olarak iki yol işlemektedir. Oksidatif fazda son ürün olarak riboz 5 fosfat üretilir, çoğu dokuda yol burada noktalanır ve oluşan riboz 5-fosfat, nükleotid sentezine yönelir. Eritrositlerde olduğu gibi primer ihtiyacı NADPH olan dokularda ise Nonoksidatif fazda riboz 5-fosfattan önceki ara ürün olan riboloz 5-fosfat transaldolaz ve transketolaz enzimleriyle tekrar Glukoz 6-fosfata katalizlenir (Şekil 1)²³.



Şekil 1: Pentoz fosfat yolu²³

2.5. Glutasyon Yolu

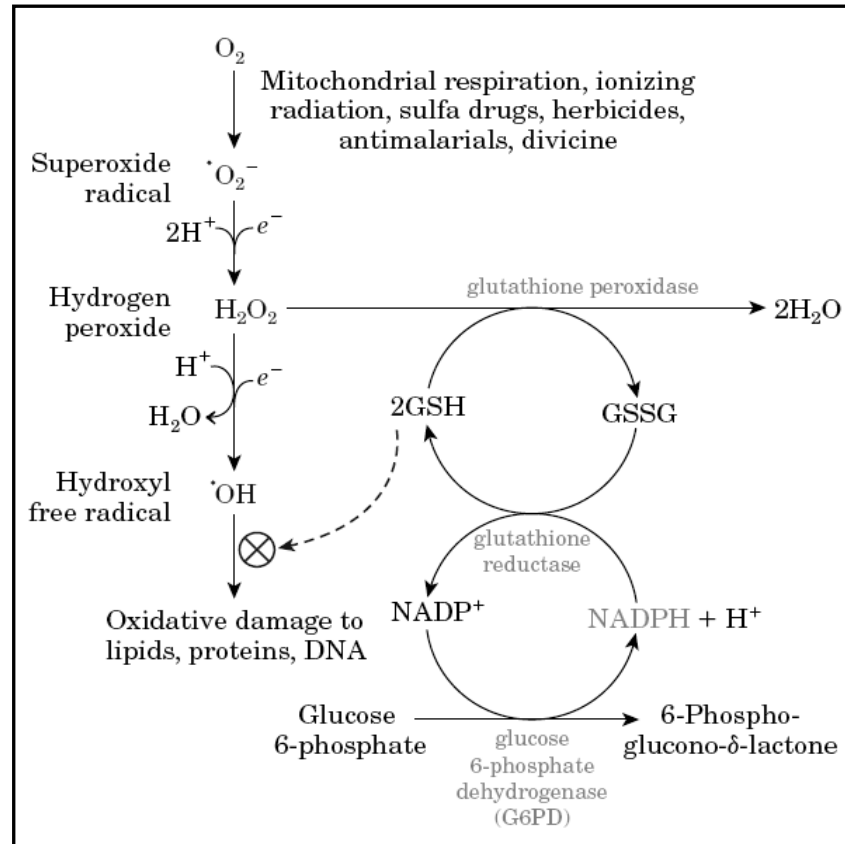
Glutasyon (GSH) hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerini oksidatif hasardan koruyan bir tripeptiddir. Metabolik yol glutasyon redüktaz enzimi tarafından NADP 'nin reversible oksidasyon ve redüksiyonu aracılığı ile pentoz fosfat yoluna bağlanır. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksidin (H₂O₂) suya (H₂O) dönüşümünü katalizler (Şekil 2)^{3,7,25}.

Glutasyonun eritrositlerde devamlı olarak sentezlenmesi gerekir. Bu sentezde glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri görev alır. Glutamil sistein sentetaz, glutamik asit ve sisteinden dipeptid oluştururken, glutasyon sentetaz dipeptide

glisin bağlanarak glutatyon oluşumunu kataliz eder. Her iki reaksiyon için ATP gerekir (Şekil 2)^{23,26}.

Oksidatif ajanlardan (enfeksiyonlar, bazı ilaçlar, bakla) kaynaklanan Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-) ve serbest hidroksil radikalleri (OH^\cdot) hücre için son derece toksiktir. GSH, H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek zehirsizleştirme (detoksifikasyon) işlemlerinde görev yapar.

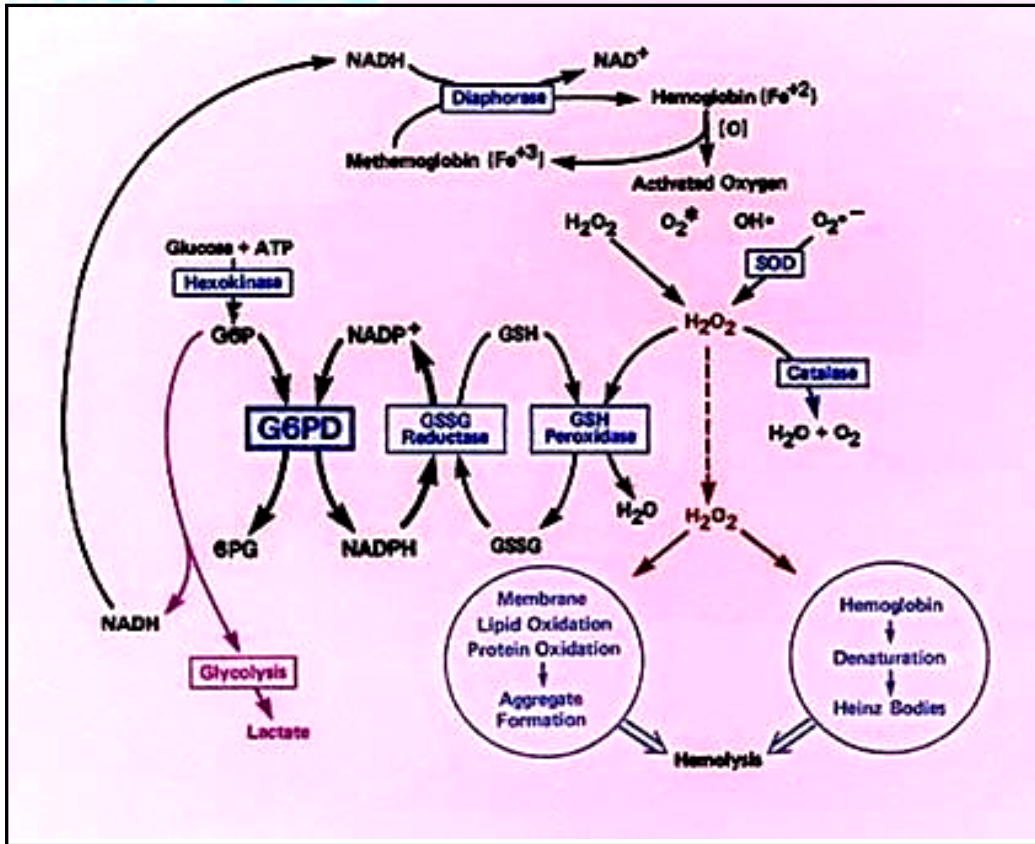
Hemoglobine oksijen bağlanması sırasında da güçlü bir oksidan olan süperoksit anyonu (O_2^-) oluşur. Son derece toksik olan süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz (SOD) etkisiyle hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşür.



Şekil 2: Glutatyon yolu²³

Hidrojen peroksidin ve diğer peroksitlerin glutatyon peroksidaz etkisiyle etkisiz hale getirilmesi sırasında GSH yükseltgenir ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) haline dönüşür (Şekil 3). Yükseltgenmiş glutatyonun glutatyon redüktaz vasıtasıyla indirgenerek yeniden kullanılabilir hale dönüşmesi için NADPH gerekmektedir^{3,25,27-29}.

Ayrıca eritrositlerde hemoglobin yapısındaki demirin indirgenmiş halde (Fe^{+2}) tutulmasında glutatyonun rolü bulunmaktadır. Fonksiyonel olmayan methemoglobinin yapısındaki yükseltgenmiş demirin (Fe^{+3}) indirgenmesi sırasında glutatyon tüketilmektedir. Bu nedenle eritrositlerin indirgenmiş glutatyonla olan gereksinimleri oldukça fazladır (Şekil 3)³⁰.

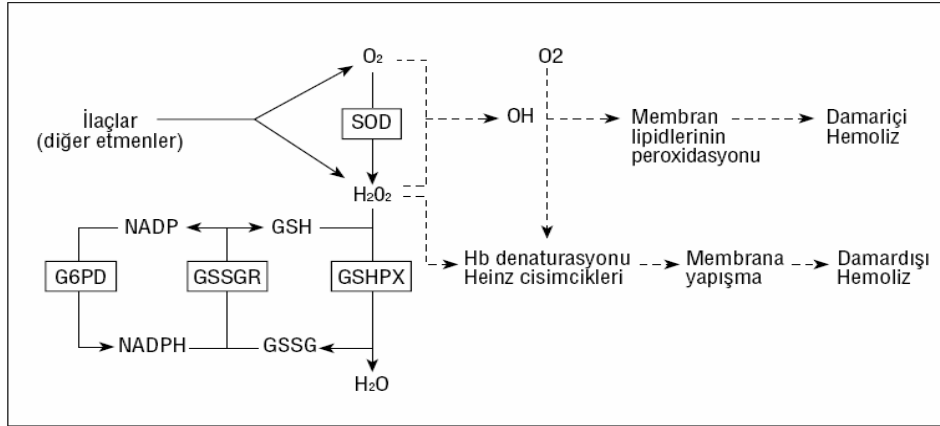


Şekil 3: Pentoz fosfat yolu, Glutatyon yolu ve hemoliz

G6PD eksikliği olan hücrelerde oksidatif ajanların (enfeksiyonlar, bazı ilaçlar, bakla) neden olduğu hemoliz genel olarak 2 yolla gerçekleşir

1-Heinz cisimciklerinin oluşumuyla beraberdir. Oksidan ajanlara mazur kalan eritrositlerde G6PD eksikliğide hidrojen peroksit ve serbest radikal artışı ile GSH okside olmaktadır. Okside glutatyon (GSSG) ve hemoglobinde mevcut sülfidril (SH) gruplarıyla oluşan sülfidril mixleri hemoglobinde konformasyonel değişim meydana getirerek irreversible denatürasyon ve Heinz cisimciklerinin presipitasyonuna neden olmaktadır. Heinz cisimcikleri eritrositin yassılaştırmış bölgesinde membranın iç tarafındaki proteinlere bağlanarak görünür bir şekilde şişlik verebilirler. Bir veya birkaç tane olabilen Heinz cisimciği inkluzyonları dalaktan geçerken fagositoz yoluyla alınır, önce eritrosit membranında kayba sonra da eritrositin tamamen parçalanmasına neden olur. Normal eritrositlerde okside glutatyon, glutatyon redüktaz enziminin kataliziyle redükte glutatyonu çevirerek hemoglobin ve diğer sülfidril gruplarını oksidasyondan korurken, G6PD eksikliği olan hücreler bu işlemi gerçekleştiremediğinden hemoliz meydana gelmektedir^{3,4,7,31,32}.

2- Serbest O₂ radikalleri ve H₂O₂ eritrosit membranındaki protein ve lipidleri okside ederek aggregate format (kümeleşme) oluşturur. Membran ve sitoplazma proteinlerinin sülfidril gruplarını etkileyerek disülfid köprüleriyle birbirlerine bağlanarak çökmesine ve mebran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Lipidlerde ise doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına bağlanarak membranın lipid kompozisyonunu değiştirir. Böylelikle hücre membranı esnekliğini kaybettiğinden damar içi stresle hemoliz gerçekleşir (Şekil 4)^{33,34}.



Şekil 4: G6PD eksikliğinde hemolizin oluşum mekanizması

2.6. G6PD enzim eksikliği

G6PD enzim eksikliğinde özellikle yeni doğanda sarılık ve belirli ilaçlara karşı hassasiyet artarken, bakla ve enfeksiyonlar hemolitik anemiye provake edebilmektedir.

G6PD eksikliğinin yol açtığı önemli sağlık sorunları şunlardır:

- * Belirli ilaçların ve bakla gibi besinlerin vücuda alımı sonrasında açığa çıkan ekstra oksitleyici ajanlar tarafından uyarılan hızla ve aniden gelişen ölümcül olabilen akut hemolitik kriz.

- * G6PD eksikliğine sahip yeni doğan bebeklerin bazılarında doğum sonrası ortaya çıkan ciddi yeni doğan sarılığı ve buna bağlı kernikterus.

- * G6PD eksikliğine bağlı kalıtsal nonsferositik hemolitik anemi^{8,33,34}.

1.Yeni doğan Sarılığında (YDS) görülen hemolitik anemi

YDS'nin (Neonatal Jaundice – NNJ) kliniği ile G6PD enzim eksikliği arasındaki ilişki 2 şekilde farklılık göstermektedir. Doğumda sarılık görülür, nadiren de ikinci veya üçüncü günde görülür. Anemiden daha çok sarılık görülür ve aneminin şiddeti daha azdır³⁵.

Yeni doğan bebeklerde G6PD enzim eksikliği varlığında, doğumun ilk günlerinde karaciğer fonksiyonlarının tam çalışabilir düzeyde olmaması ve ciddi enzim eksikliği nedeniyle bilirübinin yeterli hızda metabolize edilemez ve sarılığa yol açmaktadır Yeni doğan eritrositlerinin, glutasyon peroksidaz, katalaz ve vitamin E eksikliği sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stresle başa çıkma kapasiteleri düşük olduğundan, hemolitik anemi oluşma riski, yetişkinlerden daha fazladır. Tedavi edilmediğinde kernikterusa neden olur. Kerniktrusta, kanda yükselen bilirübin kan beyin bariyerini geçerek beynin bazı çekirdeklerine zarar verir, çocukta zeka geriliği ve spastik felce neden olabilir. Aneminin erken teşhisi norolojik sakatlıklardan kaçınma açısından oldukça önemlidir^{4,12,36}.

Lyon hipotezine göre kızlarda aktive olan X'e bağlı olarak lyonizasyon derecesine göre şiddeti değişken hastalık tabloları olabilir. Yine de etkilenen erkek bireylerde tablo daha ağırdır. Asya'da görülen G6PD eksikliklerine bağlı yeni doğan hemolitik anemiler erkek çocuklarda %4.47, kız çocuklarda ise %0.27 olarak tespit edilmiştir^{4,37}.

2.İlaçlara bağlı görülen hemolitik anemi

Daha çok Amerikan zencilerinde ve Akdeniz mutasyonu tipinde görülür. Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilerde oksidatif ilaç alımından sonra 18-72 saat içinde ani ve hızlı gelişen akut hemolitik anemi ortaya çıkabilmektedir. İlaçların (Primaquine, Nitrofuranlar, Sulfonlar, Naftalin, Aspirin vb) metabolizması sırasında üretilen serbest oksijen radikalleri G6PD eksikliğinde eritrositleri hasara uğratmaktadır. Aynı etken madde, G6PD eksikliği olan bireylerde her defasında aynı etkiyi yapmayabilir, ayrıca farklı bireylerde de, heterojen klinik seyir gösterebilmektedir. Akut hemolitik anemide,

hemoglobinüri, retikülositozis, periferik kanda Heinz cisimcikleri, parçalanmış eritrositler, tespit edilir. Akut hemolitik anemi atakları arasında hemoglobin düzeyi normaldir^{4,35,38}.

3.Enfeksiyonla görülen hemolitik anemi

Enfeksiyonla ortaya çıkan hemoliz klinik olarak görülen hemolizlerin daha yaygın bir sebebidir. Birçok farklı enfeksiyon, G6PD eksikliği taşıyan hastalarda hemolizi indükleyebilir. Herhangi bir travmaya veya enfeksiyona maruz kalan dokular, immunolojik olan veya olmayan bir etkene karşı, fagositik hücrelerle korunmaya çalışırlar. Enfeksiyon durumlarında nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonu gözlenir. Bu da PFY üzerinde glukoz metabolizmasını ve oksijen tüketimini 2-20 kat artırır. Oksijen tüketimindeki artışla birlikte nötrofillerin ve makrofajların O_2^- ile H_2O_2 salgıladıkları ve bunların dokularda birikimi ile eritrositleri hasara uğrattıkları düşünülmektedir³⁹.

4.Favizm

Baklanın (*Vicia Faba*) hemolitik etkisi, “vicine” ve “convicine” olarak adlandırılan iki glukozidik pürimidin türevine ve bunların “glucoside divicine” ve “isouramil” denilen hidrolitik ürünlerine bağlanmaktadır Bu ajanlar otooksidasyona giderek reaktif oksijen radikalleri oluşturur. “Vicine, convicine, askorbat, ve L-dopa” baklada fazla miktarda bulunan toksik olarak düşünülen bileşiklerdir. Bu bileşikler serbest oksijen radikalleri üreterek redükte glutasyonu oksitler ve G6PD eksikliği görülen bireylerde hemolize neden olur. Favizm geçirmiş kişiler, kesin olarak G6PD eksikliğine sahiptirler. Ancak G6PD eksikliği olan her birey, bakla yediğinde, akut hemolitik krize girmesi söz konusu değildir^{4,40-42}.

5.Konjenital non sferositik hemolitik anemi (CNSHA)

Bu grup hastalar hafif şekilde azalmış eritrosit yaşam süresine sahiptirler. Birçoğu klinik olarak normaldir ve düşük hemoliz gösterdikleri için laboratuvar metodlarıyla tespit edilemeyebilirler. Küçük bir bölümü konvansiyonel metodlarla kolaylıkla tespit edilebilen hemoliz derecesine sahiptirler ve açıklanamayan sarılıkları vardır. Sıklıkla başlangıcı doğumla birlikte, yeni doğan sarılığına dayanır, ileri yaşlarda anemi tekrar eder. Hemoliz, çok değişik şiddetlerde ortaya çıkabilmektedir. Kronik hemoliz, genelde hafif veya orta şiddette ortaya çıkmaktadır. Ancak nadir rastlanılan bazı G6PD varyantlarında sürekli transfüzyon gerektirecek kadar şiddetli hemoliz olabilir.

Anemi genellikle normokromdur, eritrosit morfolojisi genellikle karakteristik değildir. Kemik iliği normoblastik hiperplazi gösterir. Kronik hiperbilirubinemi, azalmış haptaglobin, artmış laktat dehidrogenaz vardır ve hemoglobinüri nadirdir. Dalak küçük çocuklarda genellikle hafif büyümüştür, takip eden dönemlerde büyüklüğü artabilir³⁵.

CNSHA, G6PD A⁻ ve Mediterranean gibi yaygın, polimorfik varyantlarda görülmez. Kronik hemolizle ilişkisinden dolayı sınıf 1 olarak kabul edilen nadir mutasyonlarda rastlanır. Kalıtsal nonsferositik hemolitik anemiye yol açan G6PD mutasyonlarının büyük bir kısmı, enzimin NADP'yi veya G6P'ı bağladığı bölgede kümelenmiştir⁴.

6. Enzim eksikliğinin diğer etkileri

G6PD eksikliğinin hücrede oksidatif stresin artmasına, aynı zamanda NO (nitrik oksit) üretiminin azalmasına bağlı olarak hipertansiyon, diabetes mellitus ve ateroskleroz gibi patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir

Hücrede oksidatif hasarların neden olduğu yaşlanma ve kanser gibi hastalıklar G6PD eksikliğinin bir sonucu olarak düşünülmektedir. Enzim eksikliği görülen hastalarda kalp ameliyatlarından sonra şiddetli hipoksi, artan hemoliz gözlenmekte ve daha fazla kan nakline ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteriyel ve viral infeksiyonlarda oksidatif metabolitler açığa çıktığından hemoliz oluşmaktadır. Hepatit A ve hepatit E'li hastalarda enzim eksikliğinin şiddetli hemoliz meydana getirdiği belirtilmiştir⁴³⁻⁴⁵.

2.7. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Pentoz fosfat yolunun ilk ve kilit enzimi olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; EC 1.1.1.49); bakteri, protozoa, mantar, sinek, balık ve memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. Bu nedenle her canlıda var olan anlamına gelen “ubiquitous” enzim olarak tanımlanmaktadır. Buna ilaveten üstlendiği biyokimyasal rol nedeniyle yaşam için gerekli olan anlamına gelen “housekeeping” enzim olarak da isimlendirilmektedir^{1,46-48}.

G6PD eksikliği, enzim aktivitesinin yada stabilitesinin azaldığı genetik bir hastalıktır. Enzim tüm hücrelerde bulunmasına rağmen, eritrositler bu eksiklikten en çok etkilenen hücrelerdir. G6PD eksikliği bazı ilaçların kullanımıyla, enfeksiyonlar sırasında, neonatal dönemde, bakla tüketimiyle ve diğer stres koşullarında hemolitik anemiyle sonuçlanabilir.

2.7.1. G6PD Geni

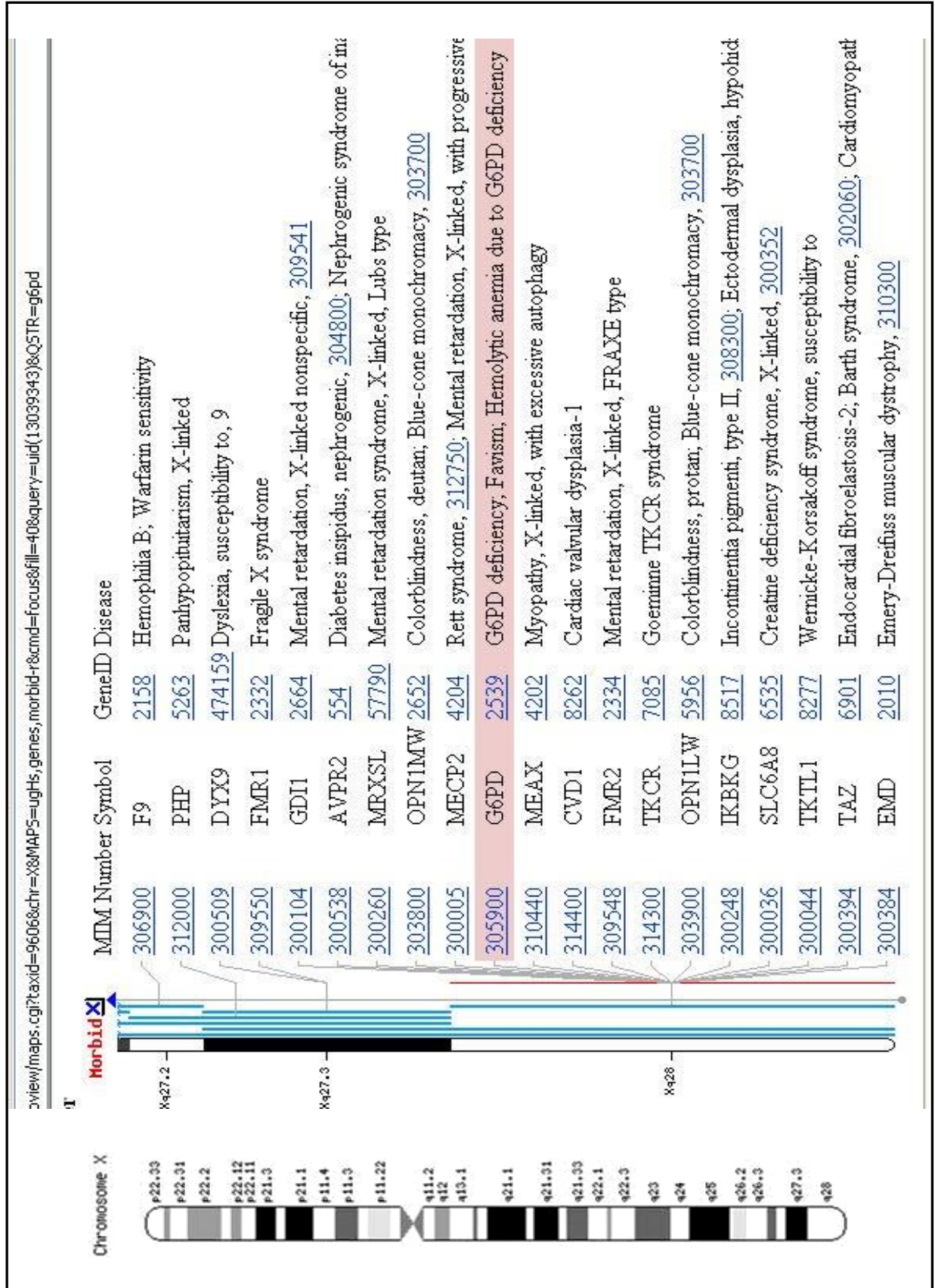
G6PD geni X kromozomunun uzun kolu üzerinde Xq28 bölgesinde lokalizedir. 20114 bç (baz çifti) uzunluğunda, 13 exon ve 12 introndan oluşmaktadır (Şekil 5). 515 aa (amino asit) uzunluğundaki G6PD enzimini, genin 1545 bç uzunluğundaki şifrelenen

bölgesi kodlamaktadır. En kısa exon 38 bç den oluşan 3. exon, en uzununu 771 bç den oluşan 13. exondur. 2. intron dışındaki bütün intronların uzunluğu 300 bç den kısadır. İkinci intron 11 kb (kilobaz) uzunluğundadır. 2625 bç uzunluğundaki G6PD mRNA'dan exon 1'in tamamı, exon 2'nin ilk 8 bç, exon 13'ün ilk 88 bç ve 3¹ ucundan 608 bç proteine dönüştürülmez^{1,14,49-54}.

Şekil 6'da G6PD geninin X kromozomu üzerinde bulunduğu bölge, Şekil 7'de genin mRNA sekansı, kodlanan baz dizisi ve amino asit sekansı verilmiştir⁵⁴.



Şekil 5: G6PD geni; 13 exon, 12 intron

Şekil 6: G6PD geninin X kromozomu üzerinde bulunduğu bölge⁵⁴.

Sekil 7: G6PD geninin mRNA sekansı, kodlanan baz dizisi ve amino asit sekansı⁵⁴.**Sequence:**

```

1  AGGGACAGCC CAGAGGAGGC GTGGCCAGCC TCCCGCCGGA AGTGGAGCCC TCCCGAGCCG
61  CCGCAGGCCG CCGCCGAGCC CCGGAPACCG GACATATAGC CCGGAGCCGG CCGAGCATGC
121  GGATGCGAGC GACTATAGCC GAGCTGAGCC GATGCCCGCC GATATTGAGC ATGCGAGCCA
181  GCGGACAGCC ATATTGAGCC GAGCCGAGCC CCGGCTGCGA CCGGATATGC CCGGAGCCGA
241  GGGGCTGGCC TGGGATGCGC GCGCACCTGC CCTGCCCGCC CCGCCGCGCC ACGAGGGGTG
301  GTGGCCGAGC CCGCCGAGCC GAGCCGAGCC CCGGAGCCGG CCGGCTGAGC CAGGCGCGCC
361  CCGCCGAGCC GCGGATATAG ATGGCCCGCC GGGGCTGAGC CCGGAGAGCC GGTGCTAGCC
421  TTGGGGCTG CAGCCGAGCC GCGGAGCCGC GCGGAGCCGC GAGGAGCCGC ATGGGAGCCG
                                     N A E
481  AGGTGGCCCT GAGCCGAGCC GAGGAGCCGC GATGCTGCGC GAGGAGCCCT TTGCGCGCCG
Q V A L S R T H V C G I L R E E L F Q G
                                     ■ dbSNP:1858827
                                     ┌────────── repeat_unit ──────────┐
541  ATGCTTTCAT TCATCCCAT ACACGATAT TCATCATCAT GGTGCTGCGC GGTGCTGCGC
D N F H S E S T W I P I I N G A S E R L
                                     ┌────────── repeat_unit ──────────┐
601  CAGAGAGAA GATGATCCC ACCATCTGGT GGTGCTGCGC GATGCTGCGC CTGCGCGAA
R K K K I Y P T I W H L F R D G L L P E
661  ACACCTTCAT CGTGGCTAT GCGGCTGCC GGTGCTGAGT GGTGCTGAGC CCGAGCAGA
N T F I V G Y A R S R L T V A D I R K G
721  GTCAGCCCTT CTGAGAGCC GCGGAGAGCC GAGGCTGAG CCGGAGAGC TTCTTGGCC
S E P F F K R I P E S W L K L E R F F R
781  GAGGCTGCTT TGTGCTGCGC GATGCTGCGC ATGAGCCCTC CTGAGAGCCG CTGAGAGCCG
R N S Y V A G Q Y D D A A S Y Q R L N S
841  ACATGATGC CCTCCACTG GGTGCTGAGC CAGCCGCTT CTCTGACTG GCTTGGCCC
H M N A L H L G S Q A N R L F Y L A L P
901  GAGGCTGCTT CAGGAGAGC ACCAGAGCA TTGAGAGCTC CTGAGAGCCG GATGAGAGCT
P Y V Y E S P T W I H E S G R S R I G
961  GAGGAGAGCT CATGCTGAGC AGCCCTTGC GAGGAGAGCT GAGGAGAGCT GAGGAGAGCT
M N R I I V E K P F G R D L Q S S D R L
1021  CAGGAGAGCT CTGCTGCTG TTCGCTGAGC ACCAGATCA CCGGATGAGC CACTGCTG
S N H I S S L F R E D Q I Y R I D H Y L
1081  CAGGAGAGCT GATGAGAGC GTCGCTGCGC TCATTTTGC CAGGAGAGCT TTGAGAGAGC
G K E N V A N L H V L S F A M R I F G P
1141  TGTGAGAGCC GAGGAGAGCT GGTGCTGCTT TCCTGAGCTT CAGGAGAGCC TTGAGAGAGC
I W N R D N I A C V I L T F K E P F G T

```

Şekil 7'nin devamı:

1201 AGGGTGGCGG GGGCTATTTG GATGAATTTG GGATCATCCG GGACGTGATG CAGAACCCAC
 E G R C G Y F D E F G I I R D V M Q N H
 1261 TACTGCAGAT GCTGTGTCTG GTGGCCATGG AGAGCCCGC CTCCACCCAC TCAGATGAGC
 L L Q M L C L V A M E K P A S T N S D D
 1321 TCCGTGATGA CAGGTCACG GTGTTGAAT GCATCTCAGA GGTGCAGGCC AACATGTGG
 V R D E K V K V L K C I S E V Q A N N V
 1381 TCCTGGGCCA GTACGTGGGG AACCCCGATG CAGAGGGGGA GGGCCACCAA GGSTACCTGG
 V L G Q Y V G N P D G E G E A T K G Y L
 1441 ACGACCCAC GGTGCCCGGC GGTCCACCA CCGCCACTTT TGCAGCCGTC GTCCTCTATG
 D D P T V P R G S T T A T F A A V V L Y
 1501 TGGAGATGA CAGGTGGGAT GGGGTGCCCT TCATCTCGC CTCCGGCAG GGCCTGAGC
 V E N E R M D G V P F I L R C G K A L N
 1561 ACGGCAGGC CGAGGTGAGG CTCAGTTCC ATGATGTGGC CGGCGACATC TTCCACCAGC
 E R K A E V R L Q F H D V A G D I F H Q
 ■ dbSNP:2230036
 1621 ACTGCAGCG CACCGAGCTG GTGATCCGCG TGCAGCCCAA CGAGCCCGTG TACCCAGA
 Q C K R N E L V I R V Q P N E A V Y T K
 1681 TGATGCCAA CAGCCCGGC ATGTTCTTCA ACCCCGAGGA GTCCGAGCTG GACCTGACCT
 M N T K K P G M F F N P E E S E L D L T
 1741 ACGGCAGCAG ATACAGAGC GTGAGCTCC CTGACCCCTA CGAGCCGCTC ATCCTGGAGC
 Y G N R Y K N V K L P D A Y E R L I L D
 ■ dbSNP:2230037
 1801 TCTTCTGCGG GAGCCAGATG CACTTGGTGC GCAGCCAGGA GCTCCGAGG GCCTGGCGTA
 V F C G S Q M H F V R S D E L R E A H R
 1861 TTTTACCCC ACTGCTGCAC CAGATTGAGC TGGAGAGCC CAGGCCATC CCCTATATTT
 I F T P L L H Q I E L E K P K P I P Y I
 1921 ATGGCAGCCG AGCCCCACG GAGCCAGAGC AGCTGATGAA CAGAGTGGGT TTCCAGTATG
 Y G S R G P T E A D E L H K R V G F Q Y
 1981 AGGGCACCTA CAGTGGGTG AACCCCCACA AGCTCTGAGC CCTGGCAGCC ACCTCCACCC
 E G T Y K M V N P H K L → unnamed protein product
 2041 CGCCACCGC CACCCTCCTT CCGCCCGCC GACCCCGAGT CCGGAGGACT CCGGACCAT
 2101 TGACCTCAGC TGCADATTCC NGCCCGGGG CTCTGGCCAC CTTGGCCCGC CCCTCGCTGC
 2161 TGCTACTACC CGAGCCAGC TACATTGCTC AGCTGCCAAG CACTCGAGAC CATCTTGGCC
 2221 CCTCCAGACC CTGCCTGAGC CTAGGAGCTT GAGTCACCTC CTCCACTCAC TCCAGCCAA
 2281 CAGAGGAGG CAGGAGGGCG CCCATTGCTC TGTCACAGAG CTTATTGGCC ACTGGTCTC
 2341 CCTCCAGTC GGGCCAGGCT GCGAGGGAGG CTCAGGGGGA GGAAGGGGC GACCACCCAC
 2401 GTGAGAGAT CTGCCTGTGG CCTTCCCGGC CAGCCTCAGT GCCACTTGAC ATTCCTTGTG
 2461 ACCAGCACA TCTCGAGCCC CTTAGATGTC CCCTGTCCCA CCAACTCTGC ACTCCATGGC
 2521 CACCCCGTGC CACCCGTAGG CAGCCTCTCT GCTATAGAA AGCCAGAGCC AGCAGCTGG
 2581 ACCCCTTCCA ACCTCAATGC CCTGCCATTA AATCCGCAA CAGCC
 ■ polyA_site

2.7.2. G6PD Geninin Kalıtımı

G6PD, X'e bağılı kalıtım gösterir. Klinik tablo genellikle hemizigot erkeklerde görülüp, anneden kız veya erkek çocuğa geçmektedir. Hasta babanın erkek çocuklarında görülmezken, kız çocuklarına mutasyon taşıyıcısı X kromozomu mutlaka geçmektedir. Heterozigot dişi bireyler, germ hücrelerinde normal ve G6PD yetmezlikli X kromozomunu bir arada taşırlar. Bu nedenle normal veya G6PD yetmezlikli çocuklara sahip olabilirler ve G6PD yetmezlikli erkek çocuğa sahip oldukları halde kendileri klinik olarak sağlıklı olabilirler.

Ekspresyondaki bu değişkenlik X inaktivasyonu işleminden kaynaklanmaktadır (Lyon hipotezi). Erken embriyo döneminde inaktive X kromozomlu bir hücreden yeni oluşacak olan bütün hücrelerde ilgili X kromozomu inaktif kalacaktır. Kadınlarda inaktive olan X kromozomu klinik tablonun çok hafif ya da çok ağır olmasından sorumlu olacaktır. Bu hipoteze göre;

1. Kadınların her bir hücresinde iki X kromozomundan sadece biri aktif, diğeri inaktiftir (Barr cisimciğı).

2. İki X kromozomundan hangisinin aktif kalacağı embriyonun erken gelişim aşamalarında rasgele tayin edilir.

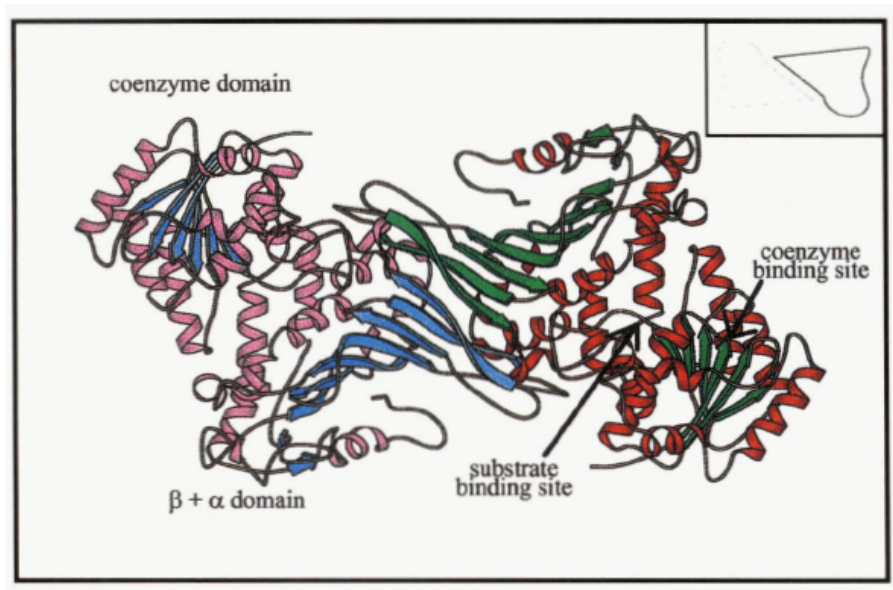
3. Her bir hücrenin çoğalmasında aynı X kromozomu bundan sonra inaktif kalır.

X kromozomunda G6PD yetmezlik geni taşıyan erkek klinik bulgu verir ve hemizigot G6PD yetmezlikli olarak tanımlanır. Dişi bireyler ise XX genotipine sahipse normal, X⁻ X⁻ genotipine sahipse homozigot ve X⁻ X genotipine sahipse heterozigot G6PD yetmezlikli olarak tanımlanırlar. Heterozigot yetmezlikli kadınlar az veya çok ama mutlaka yetmezlikli hücrelere sahiptirler ve klinik olarak değişik şiddetlerde yetmezlik gösterirler. Bireyin her hücresinde enzim aktivitesi eşit derecede azalmış

olarak bulunamaz. Kadınlarda, tüm hücrelerde yalnızca bir X kromozomu aktif olduğundan, kadın heterozigotlar normal (sağlıklı) ve enzim defektli olmak üzere iki eritrosit popülasyonuna sahiptir^{4,46,55-58}.

2.7.3. G6PD Enzimi

G6PD enzimi monomeri 515 aa'den oluşur, molekül ağırlığı mikrobiyal türlerde 50-60 kDa , memeli türlerinde ise 58-67 kDa arasında değişiklik göstermektedir. İnsanda 59 kDa'dur. Enzimin genellikle dimerik ve tetramerik yapısı aktiftir. Aktif formunu sıcaklık, NADP^+ , NADPH konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olur. Enzimin doğal substratı glukoz 6 fosfattır (G6P) ve 205. aa olan lizin bağlanır. Çeşitli türlerden elde edilen enzim, koenzim özgüllüğü bakımından NADP^+ ye spesifiktir. NADP^+ ise 386 ve 387. aa'lere bağlanır. Bir enzim dimerinde 2 koenzim bağlama bölgesi ve 2 substrat bağlama bölgesi bulunur (Şekil 8)^{4,6,35,42,53}.



Şekil 8: G6PD enzim dimeri⁶.

2.7.4. G6PD Varyantları

Dünyadaki en yaygın enzimopati olma özelliğini gösteren G6PD enzim eksikliği hemoglobinopatilerden sonra ikinci sıklıkta görülen kalıtsal bir hastalıktır. Dünya üzerinde 400 milyon kişinin enzim eksikliği taşıdığı saptanmıştır. Böyle bir yaygınlığa sahip enzimin, değişik kinetik özellik gösteren 400'ün üzerinde varyantı olduğu bildirilmektedir. Biyokimyasal özellikleri birbirinden farklı olan bu varyantların moleküler düzeyde çok farklı olmadığı gözlenmiştir. Bu varyantların çoğu dengeli bir polimorfizm göstermeleri nedeniyle herhangi bir oksidan ajanla karşılaşarak akut hemoliz atağı gösterinceye kadar asemptomatik olarak kalırlar¹³⁻¹⁶.

İlk olarak 1950'nin başlarında, Amerikalı zencilerde, antimalaryal ilaçların araştırılması sırasında ortaya çıkan hemolitik tablolar ile G6PD yetmezliği tanımlanmış ve daha sonra ilerleyen çalışmalarla Akdeniz yöresinde yaygın olarak bulunduğu tesbit edilmiştir. Enzim yetmezliğinin en sık görüldüğü bölgeler, ekvatoryal kuşakta bulunan tropikal nitelikli bölgelerdir. Bu bölgelerin diğer bir ortak özelliği de sıtma endemisi görülen bölgeler olması ve yetmezlikli bireylerin sıtmaya karşı dirençli olmalarıdır^{4,5,9,35}.

Yaygın olarak görülen G6PD A varyantı bu alelleri taşıyan heterozigot bireyleri *P. Falciparum* ve *P. Malariae* infeksiyonuna karşı korumaktadır. G6PD A varyantının normal enzime göre aktivitesi 10 kez daha düşük olduğundan parazitin eritrositlerdeki normal gelişimi için gerekli olan GSH yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, oksidatif hasarlara karşı daha duyarlı olan bu eritrositlerin yaşam sürelerinin kısalması eritrosit düzeyinde bir koruma sağlamaktadır^{4,5,9,35,59-61}.

Normal G6PD'nin, A⁺ (Afrika tipi) ve B⁺ (Akdeniz tipi) olmak üzere 2 tipi vardır. G6PD B wild-type allel olarak kabul edilir. Enzimin Afrika'lılarda görülen ve normal aktivite gösteren, hemoliz görülmeyen A tipinin, B tipine göre yalnız bir amino asit farklılığı vardır ve B tipine göre elektroforezde daha hızlı yürür. Siyah Amerikan erkeklerinin yaklaşık %20'lik bir kısmı bu varyant A allelini taşımaktadır. A⁻ olarak adlandırılan tip ise klinik olarak önemli olan anormal G6PD enzim tipi olup, siyah Amerikan erkeklerinde %11 ile en sık görülen tiptir. İlaça bağlı hemolitik anemi ile yakın ilişkisi vardır. G6PD A⁻ ve A⁺ sıtmanın yaygın olarak görüldüğü Afrika'ya özgü olarak tanımlanmasına rağmen İtalya, İspanya, Güneydoğu Asya , Orta Doğu ve Güney Amerika kökenli beyazlarda da görülmektedir.

Beyazlar arasında en yaygın görülen enzim defekti G6PD Mediterranean tipidir. G6PD B⁻ olarak ta isimlendirilir. Enzim aktivitesi normalin %1'inden daha azdır ve daha çok Akdeniz bölgesindeki beyazlarda daha fazla bulunan yaygın bir varyanttır^{2,4,61-65}. Enzim eksikliği sıklığının bazı bölgelerde %15'e ulaştığı Güney Doğu Asya'da en yaygın varyantların, Mahidol ile Canton olduğu gözlenmiştir⁶⁶.

G6PD gen anomalilerinin en çok görüleni tek bir amino asit değişikliğine neden olan nokta mutasyonlarıdır. Bunun yanında delesyon ve splicing mutasyonları da vardır. Tablo 3'de Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)¹⁶ veritabanında, bugüne kadar tespit edilmiş G6PD mutasyon çeşitleri gösterilmiştir.

Tablo 3: 2007 yılı itibariyle tespit edilmiş mutasyon tipleri ve sayıları¹⁶.

Mutasyon tipi	Mutasyon sayısı
Missense/nonsense	139
Small deletions	8
Gross deletions	1
Splicing	1
Total	149

Değişik laboratuvarlarda tanımlanmış çok sayıda varyantın birbiri ile karşılaştırma güçlüğü ortadan kaldırmak, yeni varyant belirlemenin standartlarını oluşturmak amacı ile 1967 yılında toplanan WHO (World Health Organization) Bilimsel Komitesi eritrosit G6PD enzim aktivitesi, elektroforetik analiz ve inhibitörlere yanıt gibi değişik parametrelerin varyantları tanımlamada kullanılmasını öngörmüştür. Tanımlanan varyantların oluşturduğu enzim eksikliği tablosu, elde edilen deneysel verilere ve klinik görünümlere göre de beş ana grupta toplanmıştır.

1-Kronik nonsferositik hemolitik anemili grup,

2-Genellikle hemolitik anemiye neden olamayan fakat; şiddetli enzim eksikliği gösteren grup (enzim aktivitesi %10'un altında),

3-Orta derecede enzim eksikliği gösteren grup (enzim aktivitesi %10-60 arası),

4-Çok hafif veya hiç enzim eksikliği göstermeyen grup (enzim aktivitesi normalin %60-100'ü arası)

5-Artmış enzim aktivitesi gösteren grup^{5,22,63}.

Genin cDNA dizisi ve protein yapısına OMIM – GENBANK internet sitesinde X03674 genomik numarasıyla ulaşılabilir (Şekil 7). 2. eksonun kodlanan bölgesindeki ilk ATG kodonundaki Adenin; 1 ile numaralandırılmış ve diğer varyantlarda bu numaralandırma baz alınarak isimlendirilmiştir. Dünya’da yaygın olarak tespit edilen varyant ve mutasyonların dağılımı, WHO sınıflaması ve yaygın olduğu bölgeler Tablo 4’de gösterilmiştir. Bazı mutasyonlar buldukları yerlerde farklı isimlerle adlandırılmışlardır. Tabloda alt alta yazılmış isimler aynı mutasyonun değişik bölgelerdeki farklı isimlendirmeleridir^{4,35,67,68}.

Tablo 4: G6PD varyant ve mutasyonlarının dağılımı, WHO sınıflaması ve yaygın olduğu bölgeler. *; çalışmamızda incelenen mutasyon tipleridir.

Variant ismi	Exon	Nükleotid	Amino asit	WHO sınıfı	Yaygın olduğu yerler
Gaohe Gaozhou Sapporo-like	Ex2	95 A>G	32 His>Arg	2	Çin
Sunderland	Ex2	105-107 del	35 Ile del	1	
Aures	Ex3	143 T>C	48 Ile>Thr	2	Cezayir, S.Arabistan, İspanya
Asahi Castilla Alabama Ferrara	Ex4	202 G>A	68 Val>Met	3	Afrika, İtalya, İspanya, Kanarya adaları, Meksika
Ube Konan	Ex4	241 C>T	81 Arj>Cys	3	Japonya
A	Ex5	376 A>G	126 Asn>Asp	4	Afrika , İspanya, Kanarya adaları
Mahidol	Ex6	487 G>A	163 Gly>Ser	3	Gney Asya, Çin, Tayvan
Chinese-3 Taipei	Ex6	493 A>G	165 Asn>Asp	2	Filipinler
Santamaria	Ex6	542 A>T	181 Asp>Val	2	Kosta Rika, İtalya, Kanarya adaları,

Tablo 4'ün devamı :

Variant ismi	Exon	Nükleotid	Amino asit	WHO sınıfı	Yaygın olduğu yerler
Mediterranean* Dallas Birmingham Sassari Cagliari Panama	Ex6	563 C>T	188 Ser>Phe	2	İtalya, Yunanistan, Suudi Arabistan, Türkiye, İran, Irak, İsrail, Mısır, Yahudiler, Yahudi körtleri
Seattle* Modena FerraraII Athens-like Mexico	Ex8	844 G>C	282 Asp>His	2	İtalya, İspanya, Sardinya, Kanarya adaları
Viangchan	Ex9	871 G>A	291 Val>Met	2	Hindistan, Çin, Laos, Filipinler
Kalyan	Ex9	949 G>A	317 Glu>Lys	3	Hindistan
S. Antioco*	Ex11	1342 A>G	448 Ser>Gly	?	Sardinya ⁵¹
Union* Maewo Chinese-2	Ex11	1360 C>T	454 Arg>Cys	2	Laos, Filipinler, Çin, Japonya, İspanya, İtalya
Canton	Ex12	1376 G>T	459 Arg>Leu	?	Çin, Taywan
Kaiping	Ex12	1388 G>A	463 Arg>His	2	Laos

Dünya’da bugüne kadar 400’ün üzerinde G6PD varyantı rapor edilmişken, ülkemizde bunların 20’ye yakını tespit edilmiş olup, büyük bir kısmı Çukurova ve Antalya bölgesinde saptanmıştır. Dünya’da en yaygın olarak gözlenen G6PD Akdeniz varyantının ülkemizde Çukurova ve Antalya bölgesinde yaygın olduğu moleküler düzeydeki çalışmalar ile gösterilmiştir. 1987 yılında Aksoy ve arkadaşlarının Çukurova bölgesinde yaptıkları çalışmada G6PD Adana, G6PD Samandağ ve G6PD Balcalı varyantlarını tarif etmişlerdir. Daha sonra G6PD Adana varyantının G6PD Akdeniz ve 1311 polimorfik mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir^{18,19}.

Türkiye’deki olgular daha çok Çukurova bölgesinde, Van’ın Başkale ilçesinde ve Yahudi Kürtlerinde bulunmaktadır. Türkiye genelinde %0.6, Eti Türkleri’nde %11,4, Çukurova bölgesinde %8.2, Kıbrıs’da %3.5 oranında G6PD eksikliğine rastlanmıştır^{7,28,69}.

2.8. G6PD yetmezliğinin tanısı için uygulanan yöntemler;

G6PD yetmezliğinin tanısı için enzim aktivitesi ölçümü yapılır. Dünyada yaygın olarak kullanılan 2 G6PD enzim aktivitesi ölçüm yöntemi ve 2 DNA analizi yöntemi vardır.

1. Kalitatif floresan spot test

G6PD aktivitesiyle oluşan NADPH ın tayini esasına dayanır. NADPH aktive edilerek UV ışığı ile floresan oluşumu miktarı gözlenir. Niteliksel olarak enzimin varlığını gösterir fakat bu test enzimin miktarına yönelik bilgiler vermemektedir. Kalitatif bir testtir ve sayısal bir değer verilemez. Diğer testlerle karşılaştırıldığında uyumluluk görülür. Basit, hızlı ve ucuz olması nedeniyle tarama amaçlı enzim tayinleri için kullanılabilir.

2. Kantitatif spektrofotometrik yöntem

Spektrofotometrik olarak yapılan bu testler bireyin enzim miktarını tam olarak gösterebilmektedir. Hemizigot, heterozigot, ve homozigot bireylerin tümü belirlenebilmektedir. Bu yöntem NADPH'nin 340 nm (nanometre)'de verdiği absorbans değerinin ölçülmesine dayanır. Biyokimya laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan yöntemdir. Çalışma sistematığında 25 C de 1dk da 1 mM NADP'yi NADPH'a katalizleyen enzim miktarı, enzim aktivite ünitesi olarak tanımlanır ve değerlendirilir⁷⁰⁻⁷².

3. PCR-RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism (Gen Ürününün Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesilmesi)

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, nükleik asit zinciri içinde yalnızca belirli baz dizisini tanıyıp zinciri bu diziden hidrolitik olarak kesen enzimlerdir. Böylece genin içinde olan mutasyonlar bu endonükleazlar ile kesilerek var olan kesilmemiş parçaların yapısından farklı olacaktır. Bu değişim agaroz elektroforezinde gösterilerek mutasyon noktasının ortaya çıkarılması sonucu moleküler düzeyde hastalık tanısı konmaktadır.

İncelenecek olan G6PD gen bölgesi PCR da çoğaltılır. Mutasyon bölgesini tanıyan restriksiyon enzimiyle uygun ölçeklerde karıştırılarak, enzimin aktif olduğu sıcaklık ve sürede inkübasyon yapılır. İnkübasyon ürünü %2'lik agaroz jelde yürütülerek DNA'nın kesilip kesilmediği kontrol örnekle karşılaştırılarak değerlendirilir^{50,69,73,74}.

4. PCR-SSCP; (Single Strand Conformational Polymorphism)

Tek zincirli DNA'da molekül içi etkileşim nedeniyle her bir zincir farklı formda katlanıp kıvrılır ve zincirde değişik konformasyonlar oluşur. PCR-SSCP, değişik konformasyonlar içeren aynı uzunluktaki baz dizilerinin poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Mutasyon

içeren DNA molekülü normal diziden farklı bir yapı oluşturacağından, jel elektroforezinde normalden farklı yerde bant verecektir. Normal ve incelenen örnek beraber jele yüklenerek karşılaştırıldığında normalden farklı bantların bulunması örnekte mutasyonun varlığını gösterir.

İncelenecek olan G6PD bölgesi PCR ile çoğaltılır. Amplikonlar PCR'da 90-95°C'ye kadar ısıtıldığı zaman DNA hidrojen bağlarından ayrılarak iki ayrı tek zincir haline gelir. Ortam hızla 0°C'ye kadar soğutulduğunda zincirler karşılıklı birleşemeyerek ve kendi içinde kıvrılıp katlanarak ayrı ayrı iki yapı oluştururlar. Mutasyon içeren DNA molekülü normal halinden farklı konformasyonlar oluşturup elektroforezde farklı hızda yürüdüğünden jel elektroforezde normalinden ayırt edilirler. Bu yöntemle DNA fragmentinde baz değişiminin bulunduğu belirlenebilir fakat mutasyonun türü tespit edilemez⁷⁵⁻⁷⁷.

2.9. Mikroarray ile G6PD Gen Mutasyonlarının Tespiti

Mikroarray (Nanogen Elektronik Mikroarray): Tanımlanmış tek nükleotid değişimlerinin (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) güvenilir, kısa ve verimli bir metodla tespiti özellikle rutin tanı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bugüne kadar geliştirilen metodlar PCR teknolojisinin sunduğu olanaklardan yararlanmışlardır. SNP'lerin teşhisinde yaygın olarak kullanılan metodlar arasında RFLP ve allel spesifik PCR analizi sayılabilir. Bu metodlar arasında RFLP nin her SNP için uygulanamaz oluşu (SNP'in bulunduğu bölgede herhangi bir restriksiyon enziminin tanyıp kesebileceği dizinin olmaması) ve allel spesifik PCR ise özellikle bazı SNP'lerin bulunduğu bölgelerde kesin güvenilirlikle optimizasyonunun zorluklar çıkarması açısından uygulamalarda güçlükler yaşanan tekniklerdir.

Son yıllarda geliştirilen array teknolojisinin otomasyona adapte edilmesiyle rutin analizlerde kullanma imkanı teknolojinin keşfinden bu yana üzerinde çalışılmış bir konu olmuştur. Nanogen array platformu cam bazlı array'lerden (glass array) farklı olarak kullanıcının tasarımına açık, elektronik array teknolojisine sahip olan ve rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Nanogen array, SNP analizlerinin yanı sıra gen ekspresyonu analizlerinde ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında güvenilirlikle kullanılan bir teknolojidir. Yeni bir teknik olması ve kısa sürede rutine girmesi nedeniyle, günden güne gelişmektedir. Modifiye edilebilmeye elverişli olması nedeniyle yeni uygulamalarda da kolaylıkla kullanıma açıktır.

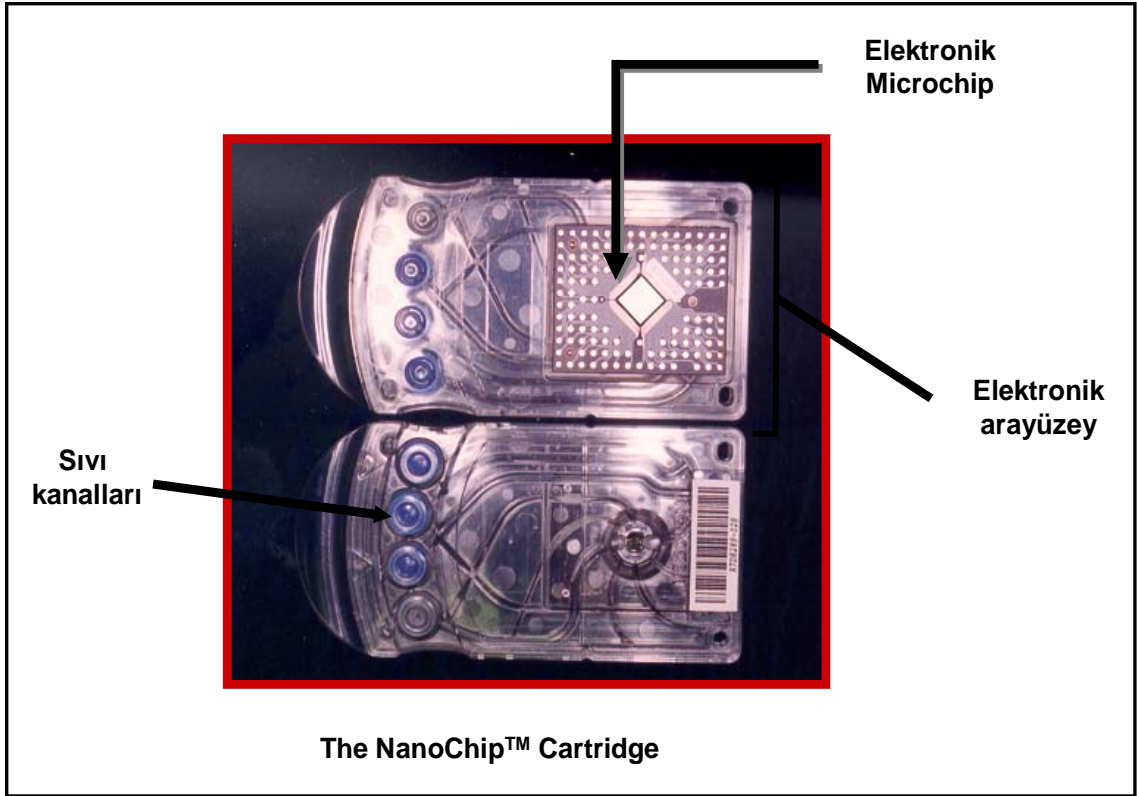
Amerika Birleşik Devletleri'nde Teksas Üniversitesi Southwestern Tıp Merkezinde yapılan tetkiklerde SNP analizlerinde Nanogen'den %100 oranında doğruluk %3 oranında tanımlanamamış örnek sonucu alınırken, ayrıca Mayo Klinikte yapılan benzeri bir karşılaştırmalı araştırmada, Nanogen'de %100 doğru %5 oranında tanımlanamayan sonuç elde edilmiş, RFLP'de %94 doğru ve %6 hatalı sonuç alınmıştır. Bu sonuçlardan hareketle Nanogen platformunu öne çıkaran özelliği otomasyonun yanında hatalı sonuç vermemesi ve güvenilir olmasıdır⁷⁸⁻⁸⁰.

Çalışma Prensipleri

Cihaz 2 ana parçadan oluşur

- 1- Loader ; Amplikonlar array yüzeyine adreslenir, yüklenir.
- 2- Reader ; Test alanlarından yayılan floresan ışınlar okunur.

NanoChip 100 tane test alanına sahip olan elektronik bir mikrodizin platformudur. Cip yapısında DNA test alanlarına ek olarak bulunan kanal sistemi örneklerin test alanlarına gönderilmesi, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin yapılmasına olanak sağlar (Şekil 9).



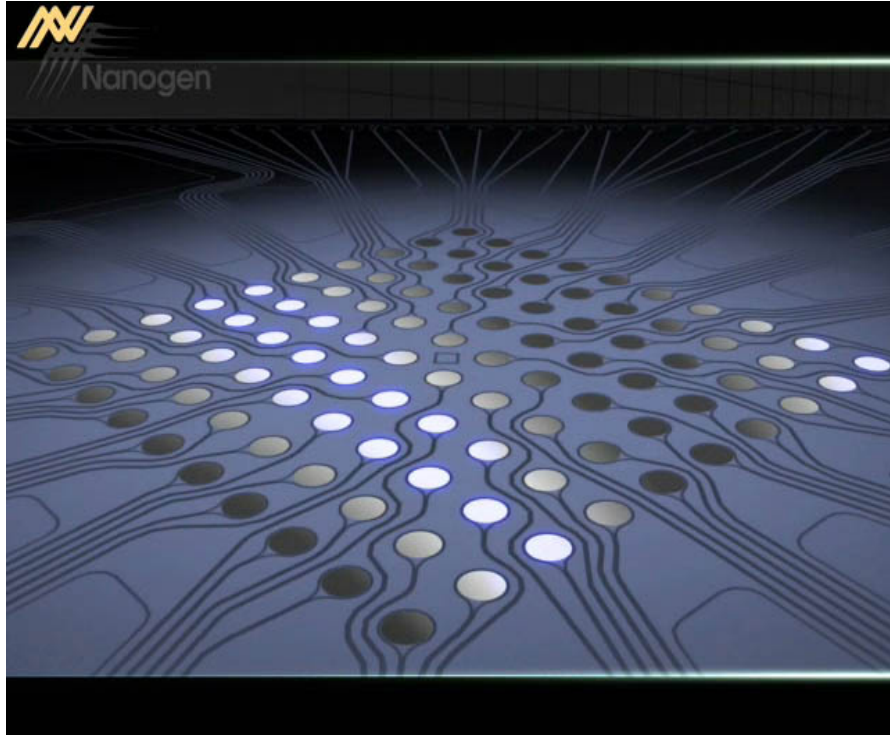
Şekil 9: Nanogen Kartuşu

SNP analizlerinde 5¹ uçlarında biotinle işaretlenmiş PCR ürünlerinin kartuş yüzeyindeki test alanlarına gönderilmesi tercih edilmektedir. Kartuş yüzeyindeki DNA test alanları streptavidin molekülleri ile kaplıdır. Test alanlarına gönderilecek DNA molekülleri 5¹ uçlarından biotin ile işaretlenirler. DNA molekülleri sahip oldukları negatif elektrik yükü sayesinde test alanlarına elektronik olarak gönderilirken ulaştıkları test alanlarına sabitlenebilmeleri için 5¹ uçlarında bulunan biotin molekülünden yararlanırlar. Biotin molekülleri streptavidin ile özgül ve güçlü kovalennt bağ kurma özelliğine sahiptir.

DNA molekülleri kartuştaki yerleşeceği yüzeye adreslendikten sonra sahip oldukları negatif elektrik yükü sayesinde cihaz tarafından otomatik olarak taşınırlar.

Elektronik olarak sadece adreslenen DNA'nın gideceği yüzey aktifleştirilerek streptavidin ve biotin'in etkisiyle DNA'nın o yüzeye sabitlenmesi sağlanır (Şekil 10).

Test alanlarına stabil bir şekilde bağlanan PCR ürünlerinin analizi mutant ve wild (yabani) tip problemlerle hibridizasyona tabi tutularak yapılır. Daha sonra, bir lazer tarayıcısı kullanılarak ortaya çıkan floresan ışımalar tespit edilir.



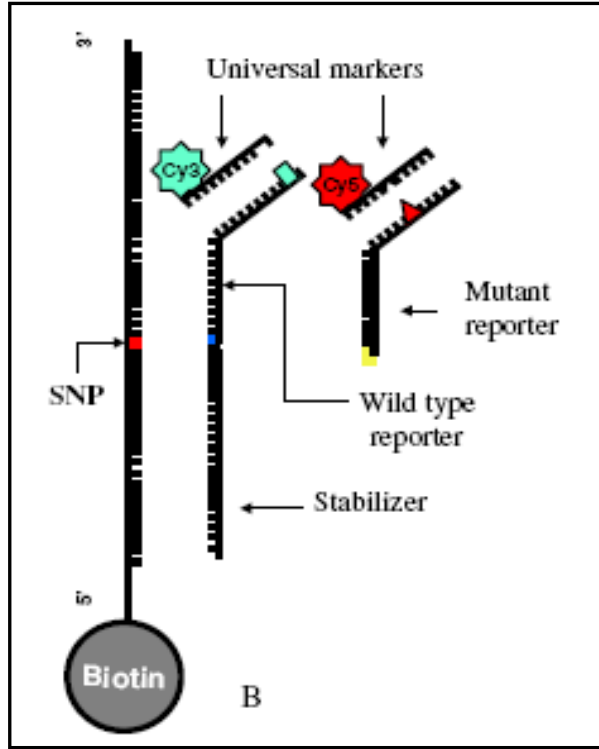
Şekil 10 : Nanogen mikroarray kartuşunda amplikonların adreslendiği 100 adet test alanı.

PCR Ürünleri

Çalışılacak olan PCR amplikonların en az 200 – 400 bp uzunluğunda olması ve tanımlanmak istenen SNP'in, yaklaşık olarak çoğaltılacak PCR ürününün ortalarına gelmesi istenir. Ürünün biotinle işaretlenmesi PCR için kullanılan primerlerden birinin biotinli olmasıyla sağlanır.

Mutant - Wild type raportör

Analizlerde tanımlanmak istenen SNP bölgesinin 5¹ ucuna bir wild tip bir de mutant tip yaklaşık 10-12 baz çiftlik bölgedeki baz dizisine özgül raportör oligonükleotidler tasarlanır. Bu oligonükleotidlerin 5¹ ucuna da reader'ın lazer tarama ile tanıyacağı floresan işaretler ile renklendirilmiş mutant ve wild type universal (evrensel) raportörler tasarlanmıştır. Analiz edilen hedef dizi ile bir alakası olmayan ve uygulanan bütün testler için kullanılan bu floresan işaretli raportörlerin özgül diziyeye bağlanabilmesini sağlayabilmek için mutant - wild tip prob dizisinin 5¹ ucuna universal raportörün dizisi de bir kuyruk olarak takılır. Böylece hibridizasyon sırasında fluoesan işaretli universal raportörler, özgül diziyeye ait problara bağlanabilir (Şekil 11)⁸¹.



Şekil 11: Amplikonlar üzerine stabilizör ve raporter'ların bağlanması.

Stabilizör

Nanogen sisteminde tek nükleotid değişimlerinin yabancı tip veya mutant problemlerin hibridizasyonu ile teşhisine kesin güvenilirlik özelliği kazandırmak için Nanochip teknolojisi bağımsız DNA molekülleri arasındaki baz etkileşim enerjisinden (base stacking energy) faydalanmaktadır. Baz etkileşim enerjisi DNA zincirleri boyunca nükleotidler arasındaki elektronların üst üste binmesi ile açığa çıkar.

Diziye özgül raportör prob'un 5¹ ucunun hemen bitiminden başlayan 25-35 nükleotidlik stabilizatör olarak tabir edilen bir ikinci oligonükleotid hibridizasyon aşamasına eşlik eder. Hibridizasyon sırasında stabilizör ve diziye özgül raportör uç uca PCR ürününe bağlanırlar. Yerleşen stabilizör 5¹ ucundaki baz ile raportörün 3¹ ucundaki baz arasında oluşan base stacking enerjisi hibridizasyonun kuvvetini arttıran bir etken olarak belirir. Kartuş hibridizasyon sonrası özgül olmayan bağlanmalardan arındırılmak üzere yıkamalara ve artan sıcaklığa maruz bırakılır (bu yıkama ve ısı protokolü her bir SNP testi için optimize edilir). Yabancı tip probun mutant allele, mutant probun ise yabancı allele bağlanması aralarındaki fark yalnızca bir bazdan ibarettir. Nanochip sisteminde uygulanan ısı ve yıkama işlemlerine ek olarak stabilizörün oluşturduğu base stacking enerjisi özgül olmayan bağlanmaların saf dışı edilmesinde etkinlik kazanır. Dolayısıyla SNP analizlerinde meydana gelebilecek yanlış eşleşmelerde test alanındaki DNA'ya bağlanmayan tek baz, stabilizör ile raportör oligonükleotid arasındaki etkileşimi değiştirecek bu da yıkama ve ısı uygulamaları sırasında söz konusu yanlış eşleşmiş problemlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştıracaktır. Base stacking enerjisinin en düşük olduğu ve bu nedenle en az arzu edilen baz kombinasyonu 2 hidrojen bağı olması nedeniyle Timin ve Adenin bazları arasındaki bağdır. Bu bilginin stabilizör ve raportör tasarımında göz önünde bulundurulması tavsiye edilmektedir. İlgilenilen DNA dizisinin

içeriği gereği stabilizör ve raportör arasında arzu edilen baz kombinasyonları oluşturulamaz ise tasarımın diğer zincir (antisense) üzerinden yapılması önerilmektedir.

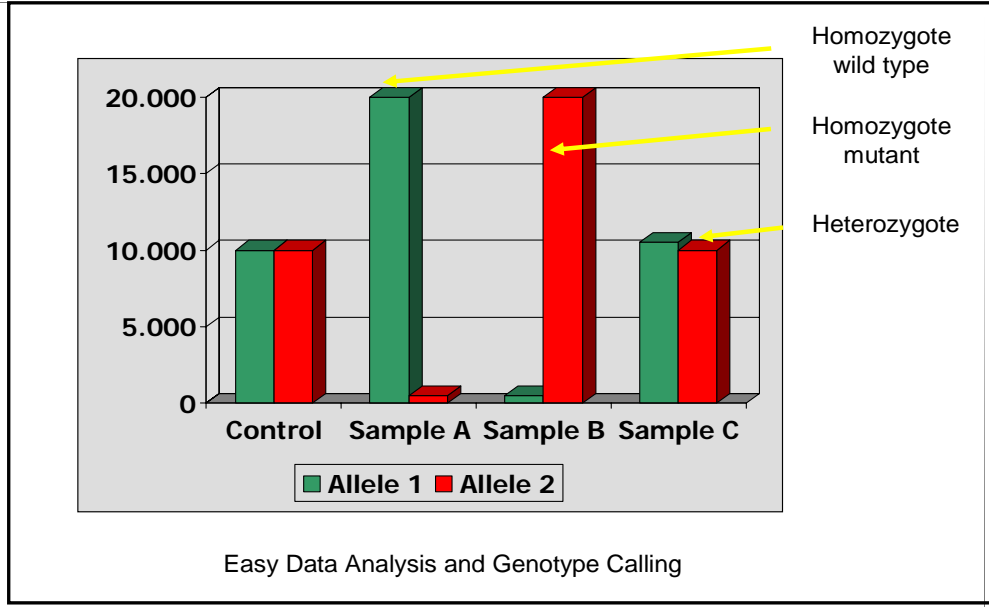
Stabilizör tasarımında dikkat edilecek hususlar;

- Raportörün uzunluğu 9-12 nükleotid arasında (evrensel kuyruk hariç), Tm'in (Temperature melting-Erime derecesi) de ortalama 30°C olmasına dikkat edilmelidir.
- Stabilizör oligonükleotidler raportörlerin hemen aşağısında yer almalıdır.
- Stabilizör oligoların Tm'leri 60°C'nin üzerinde ve 25-35 baz uzunlukta olmalıdırlar.

Array teknolojinin faydalarından biride oldukça fleksibl olmasıdır. Birçok laboratuvar da kullanılan çeşitli problemlerin pahalı floresan boyalarla işaretlenmiş şekilleri çalışmaları kısıtlamaktadır. Mikroarray, kartujların kullanıldığı, tamamiyle otomize edilmiş, son zamanların en etkili moleküler tekniğidir. Kartuj pozitif bir alanda negatif yüklü moleküllerin hızlı bir şekilde adreslenebildiği 100 adet elektiriksel alan içerir. Hedef sekanslar floresanla işaretlenmiş spesifik oligonükleotid raportörlerin bağlanmasıyla, farklı sıcaklıklar uygulanarak mutant, heterozigot ve wild tiplerin ayrılabilmesi için hibridize edilir. Raportör/hedef hibridleri uygun olmayanlar uygulanan sıcaklıkla denatüre olurlar⁸¹.

Değerlendirme;

Cihazın yazılımı hem sayısal olarak YEŞİL (WILD) ve KIRMIZI (MUTANT) miktarlarını verir, hem de grafikte değerlendirilir. Mutant floresan miktarı kırmızı piklerle, wild floresan miktarı da yeşil piklerle ifade edilir. Şekil 12'de görüldüğü gibi sadece yeşil pik varlığında; homozigot wild type, sadece kırmızı pik varlığında; homozigot mutant type, yeşil ve kırmızı piklerin birlikte varlığında; heterozigot mutant type olarak değerlendirilir.



Şekil 12: Nanogen yazılımında grafikte değerlendirme.

Sayısal olarak ;

$MUT / WILD < 1/5$ ise homozigot WILD type,

$MUT / WILD 1/2 - 2.0$ ve/veya

$MUT = WILD$ (yaklaşık) ise ; heterozigot mutant type,

$MUT / WILD > 5$ ise ; homozigot mutant type olarak değerlendirilir.

$MUT / WILD$ ve $WILD / MUT$ oranları 2 ile 5 arasında ise homozigot ve heterozigotluk açısından uygun bir değerlendirme yapılamayacağından testin tekrar edilmesi gerekir. Sayısal değerler grafiklerle teyit edilir (Şekil 13).

Fluorescence Scan Results:										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<u>82</u> 134	<u>69</u> 3890	<u>57</u> 1150	<u>74</u> 4975	<u>63</u> 3324	<u>63</u> 1543	<u>75</u> 2629	<u>1465</u> 1706	<u>103</u> 4107	<u>4421</u> 197
2	<u>85</u> 3988	<u>83</u> 5885	<u>81</u> 5622	<u>84</u> 5710	<u>67</u> 2392	<u>77</u> 3761	<u>1785</u> 2377	<u>109</u> 114	<u>91</u> 90	<u>90</u> 73
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Şekil 13: Nanogen yazılımında sayısal değerlendirme.

Şekil 13'de görüldüğü üzere 1. satır 8 no'lu olgu ve 2. satır 7 no'lu olguda KIRMIZI / YEŞİL (MUT / WILD) oranı yaklaşık 1 olduğu için heterozigot mutant type, 1. satır 10 no'lu olguda KIRMIZI / YEŞİL oranı yaklaşık 23 katı olduğu için homozigot mutant type, diğer bütün olgularda da KIRMIZI / YEŞİL oranı 1/5 den küçük olduğundan homozigot wild type olarak değerlendirilirler.

Mikroarray'in Kullanım Alanları

Moleküler biyoloji ve Genetikte

- Gen ekspresyon analizleri
- Mutasyon taraması
- Genotipleme
- Genlerin ve klonların haritalanması
- Kromozom mikrodelsyonlarının incelenmesinde kullanılmaktadır.

Hematolojide :

- Multipl miyelom
- Monoklonal gammopati
- Kronik ve akut lösemiler
- Lenfomalar gibi bazı malignitelerin moleküler sınıflamasında kullanılmaya başlamıştır.

Önümüzdeki yıllarda gen ekspresyon analizleriyle,

- Hematolojik hastalıkların tanısı,
- Hastalık alt gruplarının belirlenmesi,
- Tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi,
- Hastaya verilecek ilaçta dozaj belirlenmesi, gibi alanlarda yaygın olarak kullanılması beklenmektedir.

2.10. Çalışmanın Amacı

Bizim çalışmamızda Dünya’da ve Türkiye’de en yaygın olarak görülen G6PD Mediterranean mutasyonuna ek olarak 3 mutasyona daha bakılmıştır. Bunlar, Akdeniz ikliminin görüldüğü bölgelerde en yaygın görülen 4 missense mutasyon tipidir :

1. Mediterranean (563 C→T); Exon 6’da lokalizedir, 563. baz olan Sitozin’in yerini Timin almıştır. Dolayısıyla 188. aa olan Serin yerine Fenilalanin kodlanmaktadır. İtalya, Yunanistan, Suudi Arabistan, Türkiye, İran, Irak, İsrail, Mısır, Yahudiler ve Yahudi köktürleri’nde yaygın olarak görülmektedir. Dünyada en yaygın olarak gözlenen G6PD Akdeniz varyantının Ülkemiz’de Çukurova ve Antalya bölgesinde yaygın olduğu, moleküler düzeydeki çalışmalar ile de gösterilmiştir^{4,35,64,67,68,73}.

2. Seattle (844 G→C); Exon 8'de lokalizedir. 844. baz olan Guanin yerine Sitozin geçmiştir ve 282. aa olan Asparjik asit yerine Histidin kodlanmıştır. İtalya, İspanya, Sardinya ve Kanarya adaları'nda yaygın olarak görülmektedir^{68,82}.

3. San Antioco (1342 A→G); Exon 11'de lokalizedir. 1342. baz olan Adenin yerine Guanin vardır ve 448. aa olan Serin yerine Glisin kodlanmıştır. Sardinya adaları'nda yaygındır⁶⁸.

4. Union (1360 C→T); Exon 11'de lokalizedir. 1360. baz olan Sitozin yerine Timin geçmiştir ve 454. aa olan Arjinin yerine Sistein kodlanmıştır. Laos, Filipinler, Çin, Japonya, İspanya ve İtalya'da daha yaygın olarak görülmektedir⁶⁸.

Özellikle yeni doğan döneminde görülen ve sebebi anlaşılamayan hemolitik anemi olgularında nedeni ortaya koymak ve mutasyonu tanımlamak amaçlanmıştır.

G6PD eksikliğine bağlı hemolizin şiddeti, vakadan vakaya ve hatta aynı varyant olsa bile değişebilmektedir. Sonuç olarak eritrosit enzimopatileri heterojen bir grup olup, sebebi belirlenemeyen kronik hemolitik anemilerde veya herhangi bir oksidan ilaç alımı sonrası gelişen akut hemoliz olaylarında düşünülmesi gereken hastalıklardan biridir.

Ciddi düzeyde G6PD eksikliği doğumdan sonra erken yaşlarda saptanır ve gerekli önlemler alınırsa kişinin yaşamında önemli bir sağlık sorununa yol açmamaktadır. Bu hastalığın tedavisi şu an için mümkün değildir. Ancak yol açtığı sağlık sorunları, erken teşhis yapıldığında ve akut hemolitik krizin meydana gelmesine neden olacak etken maddelerden uzak durulduğunda kesin olarak önlenebilmektedir.

Bölgemizde yılda yaklaşık 500-800 hasta hemolitik anemi tanısıyla çocuk kliniklerine başvurmaktadır. Birçoğu ağır hemoliz geçirip ancak kan transfüzyonu ile tedavi edilebilmektedir. Bu hastaların büyük çoğunluğunda etyoloji tespit

edilememektedir. Yeni doğan hemolitik anemi vakalarının bir kısmı Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz enzimi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Gen seviyesinde bir mutasyonun var olup olmadığı, tedavi yaklaşımı ve aileye genetik danışmanlık açısından oldukça önemlidir. Bu yöntemi kullanma amacımız G6PD genindeki bu mutasyonları mikroarray teknolojisiyle, yüksek güvenilirlikle moleküler düzeyde incelemek ve mutasyonların bölgemizdeki insidansını ortaya koymaktır. Öncelikle, yeni doğan döneminde görülen ve sebebi belirlenemeyen hemolitik anemi olgularının etyolojisini araştırmak ve var ise G6PD mutasyonlarını tanımlamak amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Araç ve gereçler

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler;

Buzdolapları (+4)	Arçelik-İndesit
Derin dondurucular (-20)	Uğur-İndesit
Güç kaynağı	Biometra
Hassas terazi	Scaltec
Mikrosantrifüj	Heraeus biofuge
Mikrodalga fırın	Beko
Otoklav	Nüve
Otomatik DNA izolasyon cihazı (MagNA Pure Compact)	Roche
Otomatik Pipet takımı	Eppendorf
PCR cihazı	Applied Biosystems
pH metre	InoLab
Saf su cihazı	Aqua RO
Santrifüj	Heraeus 400
Spekrofotometre	Cecil
Ultraviöle jel görüntüleme sistemi	Biometra
Vakum pompası	Milipore
Vortex	Vortex Genie-2
Yatay elektroforez düzeneği	Protrans
Yatay çalkalayıcı	Wemixx

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler;

Agaroz	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Merk
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merk
Amonyum sülfatlı ((NH ₄) ₂ SO ₄) 10X Buffer	Fermentas
L-Histidin	Sigma
Taq DNA polimeraz	Fermentas
dNTP's	Fermentas
MgCl ₂	Fermentas
Etidium bromide	AppliChem
Jel yükleme tamponu	Sigma
10x TBE stok solusyon	Invitrogen

3.1.3. Kullanılan Solusyonlar ve Hazırlanması

3.1.3.1. PCR da Kullanılan Solusyonlar

Taq (5 u/μl), Amonyum sülfatlı 10X buffer (NH₄)₂ SO₄ (1M) ve MgCl₂ (25 mM) üretici firmanın önerdiği şekilde, dilüsyon yapılmadan kullanıldı.

dNTP's ; dNTP' ler 100 mM'lık ambalajlarda temin edildi. 10 mM elde etmek 1:9 dH₂O katılarak sulandırıldı ve kullanıldı.

Her bir mutasyon bölgesi için forward ve reverse primerler firma tarafından 50 mM'lık ambalajlarda ayrı ayrı temin edildi. Her bir bölgenin 5 mM'lık primer mixi dH₂O ile sulandırılarak hazırlandı ve kullanıldı.

3.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforez Solusyonları

1. 1 X TBE Elektroforez Tamponu

10 X TBE stok solusyonu 1:9 dH₂O ile sulandırıldı.

2. Etidium Bromide Solusyonu

%1 lik Etidium bromide solusyonu hazır olarak satın alındı. Her 50 ml'lik jele 25 µl eklendi.

3. %2 lik Agaroz Jel

1 gr agaroz tozu 50 ml 1X TBE ile çözüldü, mikrodalga fırında 500 watt'ta 2 dk kaynatıldı.

4. Jel Yükleme Tamponu

10x olarak temin edildi. 1: 9 oranında sulandırılarak kullanıldı.

3.1.3.3. Mikrochip Solusyonları

1. 50 mM L-Histidin

L-Histidine'den 3.88 gr tartıldı ve dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. 2-8°C'de saklandı. (En fazla bir hafta süre ile kullanılabilir).

2. 100 mM L-Histidin

L-Histidine'den 0.776 gr tartıldı ve dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. 1.5 ml'lik ependorflara 1 ml'lik aliquatlar steril ependorfa hazırlandı, -20°C'de saklanarak 2 ay süreyle kullanıldı.

3. 0.3 M NaOH

50 veya 100 ml'lik 1 M'lık NaOH stoku hazırlandı. dH₂O ile dilusyon yapılarak 0.3 M 'lık NAOH karışım elde edildi. 1.5 ml'lik steril ependorflara 1 ml'lik aliquatlar hazırlandı ve -20°C'de saklanarak 2 ay süreyle kullanıldı.

4. 1 M Sodium phosphate, monobasic stock

68.99 gr Sodium phosphate, monobasic ve dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

5. 1 M Sodium phosphate, dibasic stock

70.93 gr Sodium phosphate, dibasic ve d.H₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

6. 1 M Sodium phosphate, pH 7.4 stock

400 ml 1 M Sodium phosphate dibasic ile 100 ml Sodium phosphate monobasic karıştırıldı, 10 dk shakerlandı. pH'ı düşürmek için monobasic, yükseltmek için ise dibasic kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

7. 1 M Sodium phosphate, pH 7 stock

350 ml 1 M Sodium phosphate dibasic ile 150 ml Sodium phosphate monobasic 10 dk karıştırıldı. pH'ı düşürmek için monobasic, yükseltmek için dibasic kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

8. Low salt buffer (LSB)

25 ml 1 M Sodium phosphate pH:7'ye 475 ml dH₂O katılarak hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

9. High salt buffer (HSB)

25 ml 1 M Sodium phosphate pH:7.4'e 14,58 gr Sodium chloride karıştırıldı ve dH₂O ile 500ml'ye tamamlandı.

3.2. METOD

3.2.1. Olgu Seçimi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesinde Çocuk Hastalıkları servisine, sarılık veya sebebi açıklanamayan hemolitik anemi nedeniyle başvuran 800 olgu G6PD enzim eksikliği yönünden taranmıştır. Olguların enzim aktiviteleri Atatürk Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılan kantitatif spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri 4.00 U/gHb nin altında olan 60 olgu mikroarray yöntemi ile mutasyon analizine alınmıştır.

DNA izolasyonu için, periferik kan örnekleri, venöz damardan steril bir şekilde enjektörle 1-2 ml alındı. Alınan kan K₃ EDTA'lı tüplere aktarıldı. En geç 2 saat içinde total DNA izolasyonu yapıldı. Her hastadan kan örneği alınırken hemogram (Hb, RBC) çalışılması için 1-2 ml hemogram tüpüne kan alındı ve sonuçları değerlendirmeye dahil edildi.

3.2.2. Kandan DNA izolasyonu

Otomatik DNA izolasyon cihazı ile yapıldı. İzolasyon kiti olarak "MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I" kullanıldı. İzolasyon kitinin kartuşu cihazın yuvasına yerleştirildikten sonra hastanın WBC sayısı dikkate alınarak 200 - 300 µl kan örneği 2 ml'lik eppendorf tüpe konularak cihazda ilgili yerlere yerleştirildi. Cihaz çalıştırılarak 20 dk içinde 100 µl izole edilmiş DNA elde edildi.

3.2.3. Spektrofotometre ile DNA miktarının tayini

İzole edilen DNA'ların 20 µl'si dH₂O ile 1:30 sulandırılarak spektrofotometrede 260 nm'de okutuldu ve Optik Dansite (OD-Absorbans) değerleri elde edildi. Aşağıdaki

DNA derişimi formülü ile DNA miktarları hesaplandı. Olgularımızın DNA miktarları ortalaması 24 ng/µl (dağılımı: 7.5 – 54) olarak tespit edildi. (50* : 1 cm ışık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen µg/ml biriminden DNA miktarı).

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 50^*$$

$$(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 30 \times 50^*$$

3.2.4. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

PCR programı multiplex (triplex) olarak dizayn edildi. Her üç primer mix'i de aynı zamanda konularak üç bölgenin amplifikasyonu beraber gerçekleştirildi. San Antioco ve Union mutasyon bölgeleri aynı ampikon üzerinde olduğu için tek primer çifti ile amplifiye edildi. Her 3 bölgeyi amplifiye etmek için kullanılan primerlerin baz dizileri;

Med F primer; CCAGCAGAGGCTGGAACC

Med R primer; biotin - ACCATGAGGTTCTGCACCAT

Seattle F primer; AGGGACGTGATGCAGAACC

Seattle R primer; biotin - AGCTCAGTGCCTCGTCACA

San Ant-Union F primer; biotin - CTCTCCCTCACAGAACGTGAAGC

San Ant-Union R primer; CCCATAGCCCACAGGTATGCAG

3.2.4.1. PCR master mix hazırlanması:

Çalışılacak olgu sayısı ile aşağıdaki Tablo 5'de belirtilen hacimler çarpıldı. Master mix hacminin totali belirlendi. Buzlu su içerisinde her hasta için hazırlanan ve numaralandırılmış PCR tüplerine 25'er µl bölüştürüldü. Son olarak her hastanın 4'er µl DNA'sı kendi tüpüne konularak PCR'a yerleştirildi.

Tablo 5 : PCR master mix içeriği.

Çözeltiler	Miktar
dH ₂ O	13.1 µl
10X Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP' s (10 mM)	1 µl
Med primer mix (5 mM)	1 µl
Seattle primer mix (5 mM)	1 µl
San-union primer mix (5 mM)	3 µl
Taq (5 u/µl)	0.4 µl
Hacim	25 µl
DNA	4 µl
Total Hacim	29 µl

3.2.4.2. PCR Programı:

Termal Cycler cihazı Tablo 6'daki gibi sıcaklık ve süreleri girilerek programlandı. 0.2 ml'lik PCR tüplerine konulan mix'ler yerleştirilerek PCR işlemi başlatıldı.

Tablo 6 : PCR programı

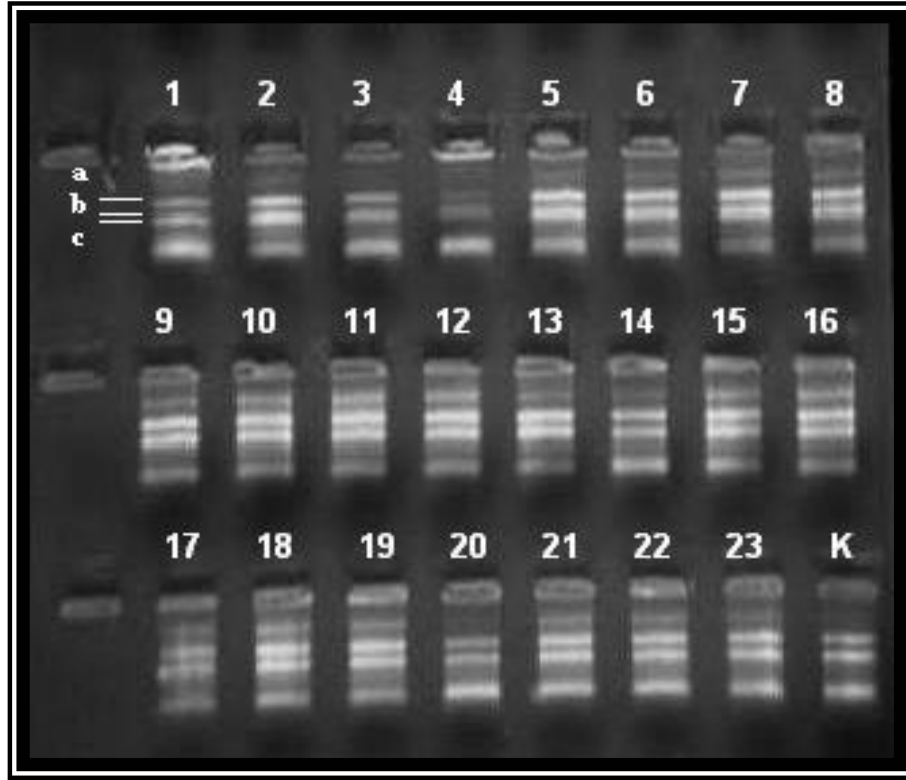
First denaturasyon	:	95°C	4 dk	
Denaturasyon	:	95°C	1 dk	} 35 cycle
Annealing	:	60°C	1 dk	
Extension	:	72°C	1 dk	
Final extension	:	72°C	10 dk	

PCR sonucunda;

- 1- Mediterranean (563 C->T) için 195 bç,
- 2- Seattle (844 G->C) için 167 bç,
- 3- San Antioco (1342 A->G) ve Union (1360 C->T) için 275 bç ampliconlar elde edilmiş oldu.

PCR sonrası ürünlerin 5 µl'si %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

Hasta DNA'ları ile her mutasyon için en az bir heterozigot kontrol örnek DNA'sı beraber yürütüldü (Şekil 14).



Şekil 14 : 23 olgu ve Mediterranean heterozigot kontrolünün jel elektroforezde yürütüldükten sonra elde edilen PCR amplicon bant paternleri; a: 275bç, b: 195bç, c: 167 bç.

3.2.5. Mikroarray'e yüklenecek PCR ampliconlarının purifikasyonu

PCR dan çıkarılan ampliconun kullanımında en ideal sonucu alabilmek için saflaştırılması yani primer, DNA artıkları ve tuzlardan temizlenmesi gerekir. Bu amaçla milipore filtrelerle yapılan, molekülleri boyut ve biçimlerine göre ayırt edebilen purifikasyon plate'ler kullanılır. Ampliconların dışarıdan oluşturulan negatif hava basıncıyla bu filtrelerden süzülmesi sağlanır. Ampliconlar, diğer primer ve DNA artıklarına nazaran daha büyük oldukları için zardan geçemezler ve plate'in dibinde kalırlar.

PCR'dan çıkarıldıktan sonra 5 µl'si yürütülen PCR ürünlerinden kalan 20-24 µl'nin üzerine 80 µl distile su eklendi. Toplam 100 µl ürün purifikasyon plağındaki

yerine yerleştirildi. Aspiratör negatif hava basıncı 8-10 mbar olacak şekilde ayarlanarak çalıştırıldı. Plağın kurumaması önemlidir bunun için 5-10 dk beklendi. Sıvı bitmeden veya bitimine yakın mutlaka kontrol edildi ve üzerine dH₂O eklendi. Aksi takdirde amplikonlar da porlardan geçecektir veya porlara yapışınca çıkarılamayacaktır. Göz kararı yaklaşık 5 µl sıvı kaldığı düşünüldüğünde aspiratör kapatıldı, üzerine tekrar 100 µl dH₂O eklenerek işlem yeniden uygulandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son aşamada 30 - 35 µl dH₂O eklenerek yatay çalkalayıcıya yerleştirildi, 10 - 15 dk çalkalandı. Amplikonların miliporlardan çözünerek suya karışması sağlandı. Amplikonlar iyice pipetaj yapılarak pürifikasyon plate'lerden alındı ve her hasta için hazırlanmış eppendorf tüpüne kondu.

Pürifikasyon sonrası amplikon kaybının var olup olmadığını anlamak için tekrar 5 µl PCR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütüldü.

3.2.6. Mikroarray Aşaması

Çalışma 2 aşamada yürütülür.

- 1- Loader – yükleme; Amplikonlar array yüzeyine adreslenir, yüklenir.
- 2- Reader – okuma; Sıcaklık, HSB, LSB, gibi etkenlerle stabilizer ve reporter'lar amplikona tutturularak yayılan floresan ışımalar okunur.

3.2.6.1. Örneklerin Array Yüzeyine Yüklenmesi (Adreslenmesi).

Loader; biotinlenmiş nükleik asit dizilerini nanochip kartuşlarının üzerindeki seçilmiş test alanlarına adresler. Cihaz otomatik olarak yüklenecek olan test alanında elektrik akımı oluşturarak nükleik asitlerin yüzeye yapışmasını sağlar. Amplikonlar biotin - streptavidin interaksyonuyla yüzeye bağlanır. Loader bir seferde 1-4 kartuşu

adresleme kapasitesine sahiptir. Amplikonlara spesifik loader map (yükleme haritası) kullanılarak tuzlardan arındırılmış amplikonlar 96 lik well plate'den kartuşa transfer edilir. Her bir amplikon 120 saniyede elektronik olarak adreslenir. Hibridizasyon ve yıkama işlemleriyle beraber toplam 2-3 saatte kartuj yüklenmesi gerçekleştirilir.

Kartuş yükleme (loader) aşaması:

Kartuş ile 50 mM Histidin +4°C'den ve 100 mM Histidin ile 0.3 M NaOH - 20°C'den çıkarıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi. Histidin çözüldükten sonra vortexlendi. Histidin şişesi Loader'a yerleştirildi ve Prime yapıldı.

1. Kartuş 150 µl L-Histidin (50 mM) kullanarak 3 kez yıkandı ve son olarak kartuş yüzeyinde histidin olacak şekilde bırakılarak 5-10 dk bekletildi.

2. Loader Map oluşturuldu; DNA'ların kartuş üzerinde yerleşeceği yerler belirlendi, adreslendi.

3. 96 lik well plate'in 1. kuyucuğuna 60 µl Histidin (50mM) pipetlendi.

4. Well plate kuyularına 30 µl Amplikon + 30 µl L-Histidin (100 mM) karışımı yapılarak pipetlendi.

5. Bir kuyucuğa 60 µl NaOH (0.3M) pipetlendi.

6. Yükleme protokolü başlatıldı.

3.2.6.2. Okuma (reader) aşaması:

Okuma öncesi kalibrasyon için cihaz çalışmadan 45 dk önce açılmalıdır. Reader'daki su şişelerinin yerine High ve Low salt buffer (HSB – LSB) şişeleri yerleştirildi ve Prime (başlangıç) yaptırıldı.

1. Yükleme yapıldıktan sonra kartuş loader'dan alındı veya +4°C'e kaldırılmış ise çıkarıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi.

2. Kartuş HSB ile yaklaşık 150 µl kullanarak 3 kez yıkandı ve son olarak yüzeyinde HSB bırakılarak 10-15 dk bekletildi. (HSB kartuş üzerindeki ürünlerin sekonder bağlantı oluşumunu artıracığından 15 dakikadan fazla bekletilmemesi gerekmektedir)

3. Bu sırada Reporter karışımı (Wild type / Mutant / Stabilizer / Universal Reporter) Tablo 7'deki miktarlarda konularak hazırlandı.

Tablo 7 : Reporter karışımı

WT reporter	1 µl
MT reporter	1 µl
Stabilizer	1 µl
WT Universal Reporter	1 µl
MT Universal Reporter	1 µl
High Salt Buffer	95 µl
Total Hacim	100 µl

Her bir SNP için, bir stabilizer, bir wild type reporter, bir mutant reporter kullanıldı. Stabilizerler ampikonun 5' ucundan, reporterler ise 3' ucundan bağlanır. Her bir raporter benzer erime sıcaklığına sahiptir.

18 nükleotidlik 2 universal marker oluşturuldu. Başka bir genom sekansıyla cross match yapmayacak bu oligonükleotidler wild type raporlerin kuyruğuna komplementer olacak şekilde Cy3 ile işaretlenmiştir. Cy5 ise mutant raporlerin kuyruğuna komplementerdir.

Tablo 8’de her bir mutasyon için forward ve reverse primerler, biotinlenmiş baz dizileri, stabilizerlar, mutant ve wild type reporter dizileri gösterilmiştir. Şekil 15’da ise bu bölgelerin G6PD geni üzerinde elde edildikleri bölgeler gösterilmiştir.

Tablo 8 : Forward ve reverse primerler, biotinlenmiş baz dizileri, stabilizerlar, mutant ve wild type reporter dizileri

G6_MedF		CCAGCAGAGGCTGGAACC
G6_MedRB	biotin	ACCATGAGGTTCTGCACCAT
G6_MedStab		CTCCCTGTTCCGTGAGGACCAGATCTACCG
G6_MedC	W	CTGAGTCCGAACATTGAG-CCAACCACATCTC
G6_MedT	M	GCAGTATATCGCTTGACA-CCAACCACATCTT
G6_SeF		AGGGACGTGATGCAGAACC
G6_SeRB	biotin	AGCTCAGTGCCTCGTCACA
G6_SeG	W	CTGAGTCCGAACATTGAG-AAACCACCAACTCAG
G6_SeC	M	GCAGTATATCGCTTGACA-AAACCACCAACTCAC
G6_SanFB	biotin	CTCTCCCTCACAGAACGTGAAGC
G6_SanR		CCCATAGCCCACAGGTATGCAG
G6_SanStab		CCCGCAGAAGACGTCCAGGATGAGG
G6_SanA	W	CTGAGTCCGAACATTGAG-TTAGTGCATCTGGCT
G6_SanG	M	GCAGTATATCGCTTGACA-TTGTGCATCTGGCC
G6_UnionC	W	CTGAGTCCGAACATTGAG-CTCACCTGCGC
G6_UnionT	M	GCAGTATATCGCTTGACA-CTCACCTGCACA

Şekil 15 : G6PD geni üzerindeki forward ve reverse primerlerin baz dizileri (gri: forward ve reverse primerler, sarı: stabilizerlar, kırmızı: mutant reporter ve yeşil: wild type reporter dizileri).

GGGAACGGGCCCCCGGCAGCATGCCAGCAATGCCACCCTGGCACCAGGGTGGGAAGGCT
TCCCGAAGGTGTTGAGCCAGAGGGTCATCTGGGAACACAAGGCACGGGAGGTGGCCACG
GGGGCAGGAGGTTCTGGCCTCTACTCCCCTGGGAGGGCGTCTGAATGATGCAGCTCTGA
TCCTCACTCCCCGAAGAGGGGTTCAAGGGGTAACGCAGCTCCGGGCTCCAGCAGAGGC
TGGAACCGCATCATCGTGGAGAAGCCCTTCGGGAGGACCTGCAGAGCTTGACCAGGCTG
TCCAACCACATCTCTCCCTGTTCCTGAGGACCAGATCTACCGCATCGACCCTACCTG med
ECAACCACATCT
GGCAAGGAGATGGTGCAGAACCTCATGGTGTGAGGTGGGCAAGCCTGGGCCGGGGGA
CCAGGTGGGGTGGTACTCAGGAGCCTCACCTGGCCACTGCCCTCCCAGAGCAATT
CCTCCAGAACTCAGACAAGGGTGACCCCTCATATGTGGCCCTGCACCACAGAGGCCCAA
GGTCAGTTCCTCCACTTGGCCCTCCCTGCAGATTTGCCAACAGGATCTTCGGCCCCATC
TGGAACCGGGACAACATCGCCTGCGTTATCCTCACCTTCAAGGAGCCCTTGGCACTGAG
GGTCGCGGGGGCTATTTTCGATGAATTTGGGATCATCCGGTGAGAGCTTCTCCTCTCTCT
GGGAGGCTGGCACAGGGTGGCAGAGCCAGTCACCCTGCAGGGCTACTCTTCCCTATCTTG
GGGAGCTCCTCCTCACCTGCAGTTCAAAACCTAAGTGTCTGAGCTATCAGACCGGGCT
GGAAGGGCTGGACCCCTACACAGCCAAGCACCCACGGTTTTATGATTCAGTGATAGCA
TCACCATGTCCTTCCCTGATTAAAGGGACCTGGGAAGCAAGGGGGATCAGGAAGTGAGT
CTTGACGTTGTACTAGGAAGCCTTGTGGGGTCCCCATGCCCTTGAACCAGGTGAAC
AGGCGGGGAGCTAAGGCAGCTCTGGCCTCTCCGTCCTCCAGGGACGTGATGCAGAAC seattle
ACCTACTGCAGATGCTGTGTCTGGTGGCCATGGAGAAGCCCGCTCCACCAACTCAGATG
CCAGCAACTC
ACGTCCGTGATGAGAAGGTAGGGGGTGCACCCAGTCCCCAGGAGCATGCCCTGTGCGAG
GCCATCTGTGACGAGGCACTGAGCTGGGGTGTGCATGCAGAGCAGGTGTCTCAACCC
GGAGAAGTACCACCTCTGAGCACAGCGTGGCCTCCCGAGGTGACCTGGACTGGCAGT
ATGAAGCCCAAGTTGTATGTCCAGGCCCTGACAGTCACTATGTGACCAGGAAGGCCAT
TGCCTCTCTGGCCCTCAGCTTGTTCATCAGAATAGACTCGAGATGGACCAGGGTGGTCT
GGAGGTCTCAGGGAGGGGCCCTGAGCTGGCCCTCTGGCAGGGTGCAGAGCCAAGCA
GGGGCCTCCTCCTGCCCTGAGGGCTGCACATCTGTGGCCACAGTCATCCTGCACCCAA
CTCAACACCCAAGGAGCCATTCTCCTTGGCTTCTCTCAGTCAAGGTGTTGAAAT
GCATCTCAGAGGTGCAGGCCAACATGTGGTCTGGCCAGTACGTGGGGAACCCCGATG
GAGAGGGCGAGGCCACCAAGGGTACTGGACGACCCACGGTCCCCGGGGTCCACCA
CCGCCACTTTTGCAGCCGTCGTCTCTATGTGGAGAATGAGAGGTGGGATGGTAGGTGAT
GCCTTCGAGGCCAGCAAGGCAGAACTGGGCATGCCCTGTGTGCGGGCACTGGAGCTCCC
ACTGAGACACTCACGCACTGGTCCACACCCTGAGAGAGCTGGTGTGAGGCTGCCCTTTC
CGCCACGTAGGGTGCCTTTCATCTGCGCTGCGCAAGGCCCTGAACGAGCGCAAGGCC
GAGGTGAGGCTGCATTCCATGATGTGGCCGGCGACATCTTCCACCAGCAGTGAAGCGC
AACGAGCTGGTGTCCGCGTGCAGCCCAACGAGGCCGTGTACACCAAGATGATGACCAAG
AAGCCGGGCATGTTCTTCAACCCGAGGAGTGGAGCTGGACCTGACCTACGGCAACAGA
TACAAGGTGCCCTACAGAGAAGGAGCAGTGTGGAGGGTGGCGGCCCTGGGCCCGGGGAC
TCCACATGGTGGCAGGCAAGTGGCATCAGCAAGACACTCTCTCCCTCACAGAACGTGAAGC
TCCCTGACGCCTAGAGCGCTCATCTGGACGTTCTTGGGGAGCCAGATGCACTCG san ant
GCCAGATGCACC
TCCGAGCTGACGCCAGCTGCCGGCCCTGCATACCTGTGGGCTATGGGGTGGCCTTGT
TGTGCAGGTGAC
CCCTCCCTCCCTGTGTGCCACCGGCCCTCCAAGCCATACATGTCCCTCAGCGACGAGC
TCCGTGAGGCCTGGCGTATTTTCAACCCACTGCTGCACCAGATTGAGCTGGAGAAGCCCA
AGCCCATCCCTATATTTATGGCAGGTGAGGAAAGGGTGGGGCTGGGGACAGAGCCAG
CGGGCAGGGCGGGGTGAGGGTGGAGCTACCTCATGCCTCTCCTCCACCCGTCACCTCC
AGCCGAGGCCACCGAGGCAGACGAGCTGATGAAGAGAGTGGGTTTCCAGTATGAGGGC
ACCTACAAGTGGGTGAACCCCAAGCTCTGAGCCCTGGGCACCCACTCCACCCCGC
CACGGCCACCTCTTCCCGCCCGCCGACCCGAGTCGGGAGGACTCCGGGACCATGAC
CTCAGTGCACATCTCTGGCCCGGGCTCTGGCCACCCTGGCCCGCCCTCGCTGCTGCT

4. Kartuşun üzerindeki HSB çekildi ve yerine 100 µl'lik reporter karışımı eklendi.

5. Reader'da çalışılacak protokol açıldı ve okutma yapıldı.

Reader'da "Temperature stripping protokol" uygulandı ve ortamdaki bağlanmayan reporterlar uzaklaştırıldı (Tablo 9). Her bir SNP için uygun ayırt edici sıcaklık wild type ve heterozigotlar gözetilerek Nanogen reader üzerinde yapıldı. Sıcaklık dereceleri ve süreler, çalışma protokolünü sağlayan firma tarafından en iyi sonuçları verecek şekilde optimize edildi.

Yıkamalar bittikten sonra son olarak cihaz, lazer teknolojisiyle tek tek her bir alanı kontrol ederek Cy3 ve Cy5 in yaydığı floresan ışınlarını tesbit etti. Bu ışınlarına göre değerlendirme yapıldı. Örnekler heterozigot kontrollerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Ham bilgi Nanogen software ile normalize edildi. Her bir SNP testinde heterozigot kontrol örnekler kullanıldı. Heterozigot örnek, elde ettiğimiz verileri normalize etmek için kullanıldı.

Tablo 9 : Readerda uygulanan Temperature stripping protokolü
(hsw: yüksek tuz yıkama, lsw: düşük tuz yıkama, scan: tarama)

Med	Seattle	San Ant	Union
56°C	56°C	56°C	56°C
60 sn	60 sn	60 sn	60 sn
53°C	45°C	41°C	46°C
30 sn	60 sn	30s n	30 sn
50°C	hsw	38°C	43°C
30 sn	hsw	30 sn	30 sn
48°C	hsw	36°C	41°C
30 sn	hsw	30 sn	30 sn
47°C	hsw	35°C	40°C
60 sn	24°C	60 sn	60 sn
hsw	scan	hsw	hsw
hsw		hsw	hsw
hsw		hsw	hsw
hsw		hsw	hsw
hsw		hsw	hsw
24°C		scan	24°C
scan		lsw	scan
		lsw	
		hsw	
		24°C	
		scan	

Diğer mutasyon bölgesini (Seattle) okumak için, Mediterranean amplikonlarına bağlı Cy3, Cy5 ve raporterlerin uzaklaştırılması gerekti. Bunun için;

- 1- Kartuş 3 kez 150 µl dH₂O ile yıkandı.
- 2- Kartuş 3 kez 150 µl NaOH ile yıkandı ve son yıkamada NaOH kartuşun üzerinde 3 dakika bekletildi. (Kesinlikle daha uzun değil, hasar görür).
- 3- NaOH kartuşun üzerinden pipetajla uzaklaştırıldı.
- 4- Kartuş 3 kez 150 µl dH₂O ile tekrar yıkandı.

NaOH ile yıkamadan önce ve sonra kartuşun çok iyi bir şekilde dH₂O ile yıkanmasına dikkat edildi.

Sonraki aşamada diğer mutasyonu okutmak için ilk okutmada yapılan işlemler tekrarlandı. HSB ile yaklaşık 150 µl kullanarak 3 kez yıkandı ve kartuşun üzerinde HSB konularak en fazla 10 dk bekletildi. HSB çekildi, hazırlanmış Seattle repoter karışımı eklendi. Reader'da çalışacak protokol açıldı ve okutma yapıldı.

Diğer mutasyonlar içinde aynı işlemler tekrar edildi. Yükleme sonrası okutmaya geçilmeyecekse kartuş dH₂O ile yıkandı ve üzerinde dH₂O bırakılarak +4°C'ye kaldırıldı. Reader'daki çalışma bittikten sonra solusyonların yerine tekrar su şişeleri yerleştirildi ve kapatıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 21'i kız (%35) 39'u erkek (%65) 60 olgu incelemeye alındı. Olguların yaşları yeni doğan ile 7 yaş arasında değişmekte idi. Mutasyon tespit ettiğimiz 2 hastanın anne ve babası da çalışmaya dahil edildi. Çalışmamıza dahil edilen olguların doğum yerleri, yaş, cinsiyet, G6PD enzim aktivitesi, hemogram ve total bilirübin sonuçları Tablo 10'da sunulmuştur. Tablodaki verilere göre hastaların yaş ortalamaları 2.79 (dağılımı: 0 - 24 yaş), G6PD enzim aktivitesi ortalamaları 2.7 U/grHb (dağılımı: 0.1 - 4.8), hemoglobin değerleri ortalamaları 13.25 gr/dl (dağılımı: 6.7 - 20.8), eritrosit sayılarının ortalamaları 5.66 s/mm³ (dağılımı: 3 - 15.7) ve total bilirübin değerleri ortalamaları 8.48 mg/dl (dağılımı: 0.3 - 31.8) dir.

Tablo 10 : Çalışmamıza dahil edilen olguların doğum yerleri, yaş, cinsiyet, G6PD enzim aktivitesi hemogram ve total bilirübin sonuçları. *; heterozigot mutant hasta, **; hemizigot mutant hasta.

Olgu No	AD SOYAD	DOĞUM YERİ	YAŞ	CİNSİ YET	G6PD (U/grHb)	HB (gr/dl)	RBC (s/mm³)	T. BİL (mg/dl)
1	G.Y.	TOKAT	YD	E	2.7	13.3	7.5	14.3
2	A.E.A.	ERZİNCAN	4	E	3	11.4	3.33	14.75
3	A.A.	ERZİNCAN	12 ay	E	3.3	9.6	12.6	30.78
4	A.P	ERZURUM	18 ay	E	3	10.8	3.58	21.84
5	B.T.	ERZURUM	YD	E	2.5	14.7	5.19	12.77
6	B.Ç.	AĞRI	5	E	2	14.4	4.71	1.13
7*	Y.B.	İĞDIR	6 ay	K	1	10.3	3.88	31.8
8	Ş.B.	İĞDIR	21	K	4.8	12.1	5.16	0.84
9**	M.B.	İĞDIR	24	E	1.5	15.6	4.53	1.44
10	C.Ç.	MUŞ	24 ay	E	3.5	11.5	4.47	15.49
11	B.T.	ERZURUM	YD	E	1.2	16.8	4.98	14.05
12	B.A.	ERZURUM	YD	E	1.3	20	5.25	16
13	B.K.	ARDAHAN	YD	K	1.5	18.6	5.25	21.8
14	T.A.K.	BİNGÖL	2 ay	E	1.8	13.1	3.64	1.63
15	A.A.	ERZURUM	6	E	2	11	4.47	0.34
16	B.G.	ERZURUM	YD	E	2.9	16.3	5.09	18.5
17	Y.C.Y.	ERZURUM	6 ay	E	1.8	9.9	3	18.06
18	M.Z.U.	ERZURUM	YD	E	3.1	10.9	5.47	0.28
19	K.A.	KARS	3	E	2.9	13.2	5.20	0.33
20*	Z.B.	İĞDIR	24 ay	K	2.1	11.7	4.96	0.53
21	Z.K.	ERZURUM	12 ay	K	2.8	9.7	3.35	16.13
22	A.Ç.	ERZURUM	8 ay	K	1.4	14.6	4.7	9.06
23	N.Ö.	ERZURUM	4	K	0.1	13.1	4.2	2.6
24	S.T.	ARTVİN	12 ay	K	3.6	13	10.6	13.1
25	A.Ö.	ERZURUM	2.5	K	2.6	11.6	3.93	7.5
26	R.S.G	ERZURUM	12 ay	K	3.6	11.4	4.83	0.69
27	T.A.	ERZURUM	8 ay	E	1.9	13.6	4.5	3.4
28	K.Ç.	ERZURUM	6	K	2.8	9.7	3.45	0.3
29	A.K.	ERZURUM	5	E	3.8	14.3	5.13	1.3
30	S.K.	ERZURUM	12 ay	E	3.5	12	8.5	9.4
31	A.S.A.	ERZURUM	4 ay	E	2.7	15.5	5.3	15.7

Tablo 10'un devamı :

Olgu No	AD SOYAD	DOĞUM YERİ	YAŞ	CİNSİ YET	G6PD (U/grHb)	HB (gr/dl)	RBC (s/mm ³)	T. BİL (mg/dl)
32	E.O.	ERZURUM	4	E	3.9	19.6	15.7	1.62
33	Y.O.A.	KAYSERİ	7	E	2.3	14.6	6.1	0.3
34	M.B.K.	ERZURUM	6 ay	E	2.4	20.5	5.87	13.4
35	Y.C.P.	ERZURUM	18 ay	E	3.8	6.7	8.7	7.8
36	M.U.K.	ERZURUM	18 ay	E	2.1	14.7	6.2	3.32
37	M.M.Y.	ERZİNCAN	7	E	3.2	12.4	4.38	0.36
38	Z.B.Y.	ERZİNCAN	6	K	4	11.8	4.16	0.38
39	H.K.Y.	ERZİNCAN	3	K	3.8	11.2	4.77	0.69
40	İ.D.	ERZURUM	5	E	3.8	14	8.95	0.65
41	E.C.	ERZURUM	6	E	2.4	13.9	4.9	1.41
42	İ.Ö.	ERZURUM	YD	K	3.7	18	10.3	22.4
43	İ.Y.	ERZURUM	7	K	2.7	13.5	5.15	1.15
44	Ş.Y.	ERZURUM	3	E	3.5	13.9	5.48	0.21
45	C.S.	ERZURUM	7	E	2.8	14.4	8.2	0.87
46	B.K.	ERZURUM	2	E	3.7	9.4	3.91	0.23
47	C.Y.	GİRESUN	5	K	0.1	13.4	4.65	0.43
48	E.H.A.	ERZURUM	18 ay	E	2.9	20	10.2	6.11
49	S.A.	ERZURUM	12 ay	K	2.1	14.8	4.55	0.63
50	A.K.O.	ERZURUM	18 ay	E	2.8	12.74	5.17	9.5
51	S.O.	ERZURUM	4	E	3.2	13.7	4.7	1.55
52	Y.B.	ERZURUM	18 ay	E	3.8	8.6	5.21	8.3
53	E.T.	ERZURUM	5	K	2.1	12.7	4.5	0.35
54	M.S.K.	ERZURUM	8 ay	E	2.7	10.9	4.8	18.8
55	E.Ç.	ERZURUM	12 ay	K	2.7	15.1	4.09	19.75
56	M.E.Y.	ERZURUM	14 ay	E	2	19.1	5.45	19.14
57	H.E.A.	ERZURUM	12 ay	E	3.7	19.6	5.96	24.05
58	S.T.	ERZURUM	12 ay	K	3.5	18.6	5.61	5.47
59**	B.A.	ERZURUM	YD	E	-	20.3	5.45	10.64
60	B.K.	ERZURUM	YD	K	-	20.8	6.24	13.05

Çalışmamıza dahil edilen olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, Hb, eritrosit sayısı ve total bilirübin değerlerinin ortalamaları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11 : Olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, Hb, eritrosit sayısı ve total bilirübin değerlerinin ortalamaları.

	Kadın	Erkek	Genel
Olgu sayısı	21	39	60
YAŞ (yıl)	3.0	2.67	2.79
G6PD enzim aktivitesi (U/grHb)	2.55	2.77	2.7
Hemoglobin (gr/dl)	13.1	13.3	13.25
Eritrosit Sayısı ($\times 10^9$ s/mm³)	5.15	5.94	5.66
Total Bilirübin (mg/dl)	8.06	8.71	8.48

Çalışmamıza dahil edilen 60 olgunun cinsiyetlerine göre çalıştığımız 4 G6PD mutasyonunun dağılımı Tablo 12'de sunulmuştur. 60 hastadan 2 heterozigot mutant, (%3.33) ve 2 hemizigot mutant (%3.33) Mediterranean alleli tespit edildi. Çalıştığımız diğer 3 allelde mutasyon bulunmamaktadır.

Tablo 12 : Çalışmamıza dahil edilen 60 olgunun cinsiyete göre G6PD mutasyonlarının dağılımı.

G6PD mutasyonları	Kadın	Erkek	Genel
Mediterranean	2	2	4
(563 C→T)	(%3.33)	(%3.33)	(%6.66)
Seattle	0	0	0
(844 G→C)	(%0)	(%0)	(%0)
San Antioco	0	0	0
(1342 A→G)	(%0)	(%0)	(%0)
Union	0	0	0
(1360 C→T)	(%0)	(%0)	(%0)
Genel	2	2	4
	(%3.33)	(%3.33)	(%6.66)

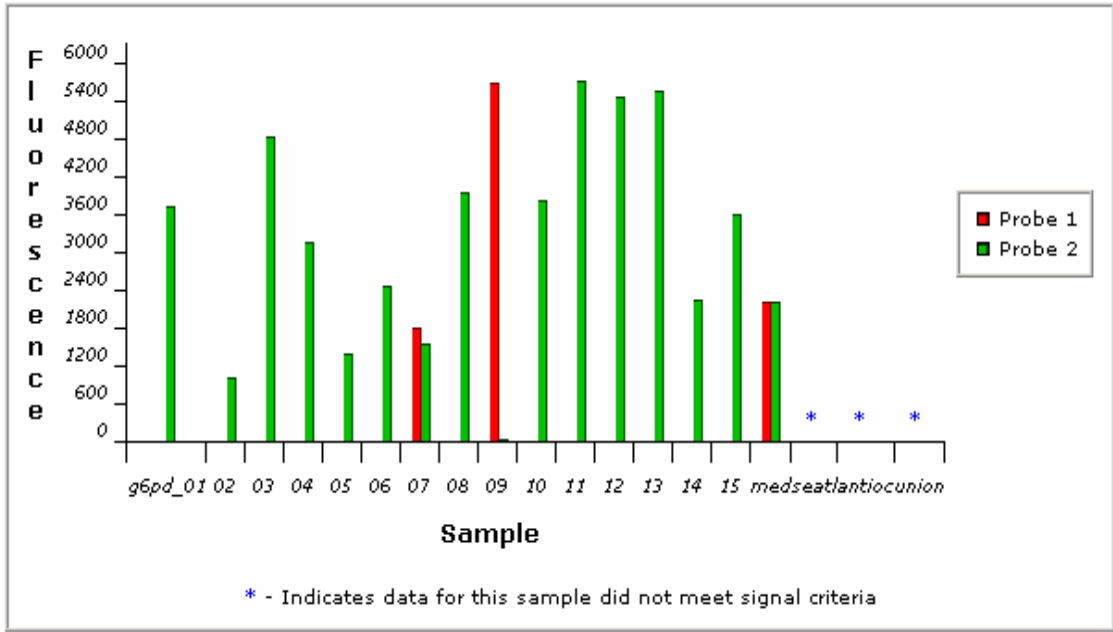
Mediterranean (563 C→T) mutasyon analiz sonuçları

Çalışma sonucunda 60 hastadan 2 heterozigot mutant, (olgu 7 ve 20) ve 2 hemizigot mutant (olgu 9 ve 59) allel tespit edildi. Diğer 56 hastada normal genotip görüldü. Bu sonuçlarla Akdeniz mutasyonu bölgemizde %93.3 normal-wild, %3.33 heterozigot mutant, ve %3.33 hemizigot mutant type oranında görüldüğü tespit edildi. Çalıştığımız ilk 15 olgunun analiz sonuçları Şekil 16'de grafik olarak, Tablo 13'de sayısal değer olarak gösterilmiştir.

Şekil 16'da görüldüğü gibi olgu 7'de hem mutant hem de wild floresan pik birlikte görüldüğünden heterozigot mutant allel olarak değerlendirilmiştir. Olgu 9 erkektir ve tek X kromozomu olduğundan yalnızca mutant pik görülmektedir ve hemizigot mutant olarak değerlendirilmiştir. Mediterranean heterozigot kontrolümüzde

her iki piki birlikte vermiş ve çalışmamızı teyit etmiştir. Diğer bütün olgularda sadece wild allel pik görülmektedir.

Şekil 16 : Çalıştığımız ilk 15 hastanın Mediterranean mutasyon analiz sonuçları



Sayısal değerlendirmeye bakıldığında Tablo 13’de görüldüğü gibi olgu 7’de kırmızı (mutant) floresan sayısal değerinin 1821 ve yeşil (wild) floresan sayısal değerinin 1572 olduğu görülmektedir. Kırmızı / yeşil oranı 1.16 / 1 olduğu için heterozigot mutant olarak değerlendirilmiştir. Olgu 9’da kırmızı değerinin 5714, yeşil değerinin 63 olduğu ve kırmızı / yeşil oranının 90.71 / 1 olduğu görüldüğünden hemizigot mutant olduğu tespit edilmiştir. Mediterranean heterozigot kontrolümüzde de oranın 1/1 olduğu görülmektedir. Diğer olguların hepsinde yeşil floresanın kırmızı floresana baskın olduğu görülmüş ve homozigot wild type olarak değerlendirilmişlerdir.

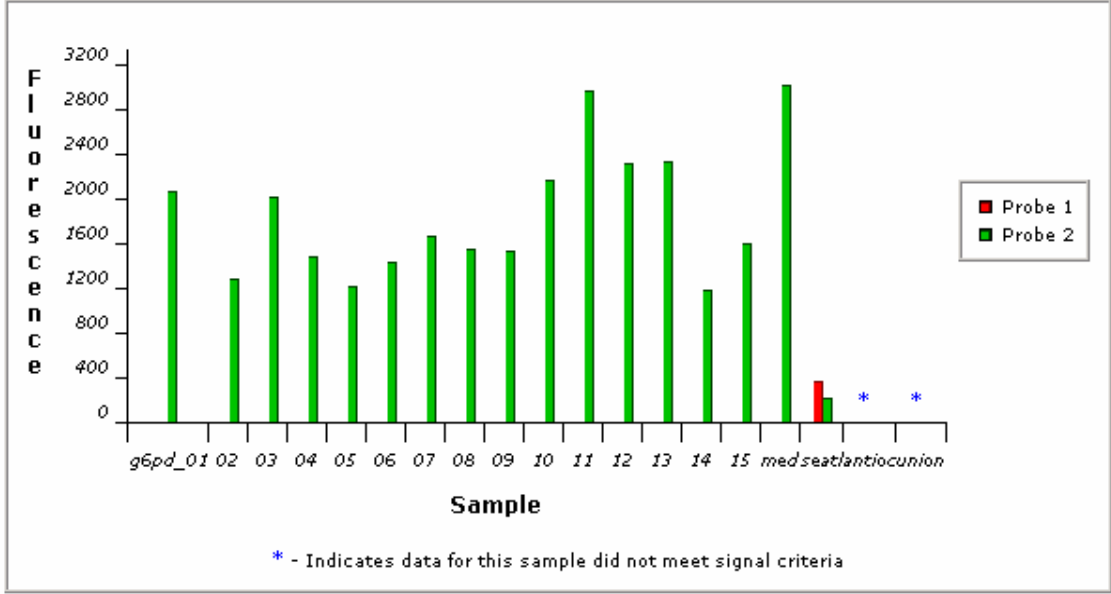
Tablo 13 : Çalıştığımız ilk 15 hastanın Mediterranean mutasyon sayısal değer sonuçları

Results for g6pdh (MED_SCAN_LOW)					
Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
g6pd_01	0	3756	1	Inf	wild/wild
02	0	1016	1	Inf	wild/wild
03	0	4841	1	Inf	wild/wild
04	0	3190	1	Inf	wild/wild
05	0	1409	1	Inf	wild/wild
06	0	2495	1	Inf	wild/wild
07	1821.53	1572	1	1.16 :: 1	mut/wild
08	27.66	3973	1	1 :: 143.64	wild/wild
09	5714.84	63	1	90.71 :: 1	mut/mut
10	3.95	3854	1	1 :: 975.38	wild/wild
11	1.32	5751	1	1 :: 4366.45	wild/wild
12	0	5488	1	Inf	wild/wild
13	2.63	5576	1	1 :: 2116.79	wild/wild
14	0	2258	1	Inf	wild/wild
15	0	3627	1	Inf	wild/wild
med	2243	2243	1	1 :: 1	mut/wild
seatl	N/A	N/A	0	N/A	N/A
antioc	N/A	N/A	0	N/A	N/A
union	N/A	N/A	0	N/A	N/A

Seattle (844 G→C), San Antioco (1342 A→G) ve Union (1360 C→T) mutasyon analiz sonuçları

Hastalarımızın tamamında bu mutasyon tiplerinde normal genotip görülmüştür. Bunlara ait mutant allellere bölgemizde rastlanmamıştır. Örnek olarak ilk 15 olgunun Seattle mutasyon analizine ait sonuçlar Şekil 17 ve sayısal analiz sonuçlar da Tablo 14’de gösterilmiştir. Tablolarda görüldüğü gibi bütün olgularımızda homozigot wild pikler görülmektedir. Diğer 2 (San Antioco ve Union) mutasyon tipinde de benzer sonuçlar elde edilmiş ve heterozigot veya mutant allellere rastlanılmamıştır.

Şekil 17 : Çalıştığımız ilk 15 hastanın Seattle mutasyon analiz sonuçları



Tablo 14 : Çalıştığımız ilk 15 hastanın Seattle mutasyon sayısal değer sonuçları

Results for g6pdh (G6PDH_SE_LOW)					
Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
g6pd_01	0	2152	1	Inf	wild/wild
02	0	1335	1	Inf	wild/wild
03	0	2108	1	Inf	wild/wild
04	0	1558	1	Inf	wild/wild
05	0	1274	1	Inf	wild/wild
06	0	1497	1	Inf	wild/wild
07	1	1740	1	1 :: 1740	wild/wild
08	0	1615	1	Inf	wild/wild
09	1	1604	1	1 :: 1604	wild/wild
10	0	2252	1	Inf	wild/wild
11	0	3094	1	Inf	wild/wild
12	0	2419	1	Inf	wild/wild
13	0	2442	1	Inf	wild/wild
14	0	1231	1	Inf	wild/wild
15	0	1669	1	Inf	wild/wild
med	0	3149	1	Inf	wild/wild
seatl	383	232	1	1.65 :: 1	N/A
antioc	N/A	N/A	0	N/A	N/A
union	N/A	N/A	0	N/A	N/A

5. TARTIŞMA

Eritrositler olgunlaşarak dolaşıma geçtikten sonra organelleri olmadığı için enzim ve protein sentezleyemezler. Bu nedenle ortaya çıkabilecek oksidatif hasarlara karşı oldukça hassastırlar. Olgun eritrositlerin biyosentez yeteneğinin olmaması nedeniyle glutasyon düzeylerini dengede tutabilmek için gerekli NADPH'lar pentoz fosfat yolundan elde edilir. İndirgenmiş glutasyon ekzojen ve endojen kaynaklı hidrojen peroksit ve diğer oksidatif ajan türlerine karşı eritrositleri korumaktadır. G6PD enzimi PFY'nun ilk basamağında yer alan düzenleyici enzimdir^{3,4,7}.

Eritrositlerde, glukozun %10'u PFY'na girmektedir. Enzim, glukoz-6-fosfatın, 6 fosfoglukanolaktone dönüşümünü kataliz ederken NADP'nin NADPH'a dönüşümünü sağlamaktadır. Oluşan NADPH'lar bir çok biyokimyasal olayın düzenlenmesinde kullanılmaktadır ve hücreye enerji temin etmektedir. Buna ilaveten G6PD geni tüm dokularda mevcut olup üstlendiği biyokimyasal rol nedeniyle yaşam için gerekli olan anlamına gelen "housekeeping" enzim olarak da isimlendirilmektedir. G6PD enzimi X kromozomu üzerinde bulunan G6PD geni tarafından kodlandığı için X'e bağlı geçiş göstermektedir. Bunun sonucu olarak erkeklerde hemizigot, kadınlarda ise heterozigot ya da homozigot olarak ifade edilmektedir^{1,47,48,50}.

G6PD enzim eksikliğinde başlıca klinik belirtiler yetişkinlerde hemolitik anemi ve yeni doğanda neonatal sarılıktır. Hemoliz stres, ilaç alımı, enfeksiyonlar ve bakla yenmesi ile ilişkilidir^{8,33,34}.

Erzurum’u içerisine alan Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesini kapsayan bu çalışmada G6PD eksikliği ve bu eksikliğin moleküler boyutu araştırılmıştır. Biyokimyasal olarak G6PD enzim aktivitesi eksikliği olan kişilerin G6PD geni üzerinde mutasyonun olup olmadığını anlamak amacıyla bu yörede mikroarray çip yöntemiyle yapılan ilk tarama ve tanı amaçlı çalışmadır. Çalışmada Avrupa ve Asya kıtalarında en fazla rastlanan 4 mutasyon taranmıştır. Bunlardan Mediterranean mutasyonu Dünya’da ve Türkiye de en sık görülen mutasyondur^{17,18}.

Enzim eksiklikleri içinde en yüksek insidansı gösterdiği bilinen G6PD enzim eksikliğinin, yeryüzünde 400 milyondan fazla insanı etkilediği rapor edilmiştir. Başta sıtmanın yaygın görüldüğü tropik bölgeler olmak üzere Afrika ve Akdeniz bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir. Dünya’da bugüne kadar 400’ün üzerinde G6PD varyantı rapor edilmişken Ülkemiz’de bunların 20’ye yakını tespit edilmiş olup, büyük bir kısmı Çukurova ve Antalya bölgesinde saptanmıştır¹³⁻¹⁶. Dünya’da en yaygın olarak gözlenen G6PD-Akdeniz varyantının Türkiye’de de Çukurova ve Antalya bölgesinde yaygın olduğu moleküler düzeydeki çalışmalar ile gösterilmiştir. G6PD enzim eksikliği Türkiye genelinde %0.6, Eti Türklerinde %11.4, Kıbrıs’ta %3.5 Çukurova Bölgesi’nde ise %8.2 oranında görülme sıklığı olduğu rapor edilmiştir^{7,28,69}. Çalışmamızda 800 hemolitik anemili olguda enzim aktivitesi ölçülmüş, enzim aktivitesi 4.0 U/gHb ve altında olan 60 olguda mutasyon analizine geçilmiştir. Hemolitik anemili bireyler arasında %7.5 oranında enzim eksikliği bulunmuştur.

İtalya’da yapılan G6PD mutasyon araştırmalarında G6PD Mediterranean (563 C→T) mutasyonu tüm mutasyonlara oranla %84, San Antioco (1342 A→G) %2.8, Union (1360 C→T) ise %8.5 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte G6PD Mediterranean (563 C→T) mutasyonu Kuzey İtalya’da %66.6, Güney İtalya’da % 41.5,

Suudi Arabistan, Irak, İnan, Ürdün, Lübnan ve İsrail kökenli ailelerde yapılan çalışmalarda bütün varyasyonlara oranla %95.2 oranında bulunmuştur^{15,65,68,83}.

Bu çalışmamızda mikroarray yöntemiyle yaptığımız mutasyon taraması sonucunda G6PD geninde 60 olgunun 4'ünde (%6.66) G6PD Mediterranean mutasyonu tespit ettik. Bulduğumuz bu mutasyonların 2'si heterozigot (olgu 7 ve 20), 2'si de hemizigot (olgu 9 ve 59) Mediterranean mutasyonlarıdır. Bulduğumuz mutasyonların tamamı (%100) Mediterranean mutasyonudur. Elde edilen bu veriler Tuli ve ark. Çukurova yöresinde yaptığı çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; Tuli, Mediterranean mutasyonunu tüm mutasyonlar içerisinde %53 oranında bulmuştur⁸⁴. Açıkbaz ve ark. Antalya'da 50 G6PD enzim yetmezlikli olgu üzerinde yapmış oldukları çalışmada %70 oranında Mediterranean mutasyonu tespit etmişler⁸⁵. Keskin ve ark. Denizli'de 1950 olgudan 24'ünde (%1.23) G6PD yetmezliği ve PCR-RFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada Mediterranean mutasyonunun tüm mutasyonlara oranının %79 olduğunu bulmuşlardır⁸⁶. Bu verileri kendi sonuçlarımızla karşılaştırdığımızda farklılık olduğu görülmektedir. Bunun sebebi araştırmacıların farklı bölgelerde çalışması ve farklı sayılarda olgular üzerinde sonuçlar elde etmesidir. Ülkemizde tüm Türkiye'yi içine alan geniş çaplı mutasyon analizleri bulunmamaktadır. Daha çok bölgesel ve dar kapsamlı çalışmalar vardır. Ancak çalışmamızda elde edilen sonuçlar Türkiye'nin farklı bölgelerindeki verilerle paralellik göstermektedir. Türkiye'de en sık görülen Mediterranean mutasyonunun bizim çalışmamızda da en sık görülen mutasyon olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca Özmen ve ark. tarafından Doğu Anadolu Bölgesi'nde 1183 olgu üzerinde tarama yapılmıştır. Rastgele seçilen bu olgularda exon 5'de 2 adet ve exon 6 ve 7'de 1 adet olmak üzere toplam 3 (%0.25) olguda tipini tanımlayamadıkları

mutasyonlar bulmuşlardır²². Rastgele örneklerle yapılan bu çalışma da olgu seçimi belli bir kritere göre olmamıştır. Veriler sadece ön bilgi niteliği taşımaktadır ve Doğu Anadolu Bölgesi'ni tam olarak yansıtmamaktadır. Bizim çalışmamızda çalışılan örnek sayısı az olmasına karşın, 2 yıl içerisinde hemolitik anemi ön tanısı alan ve G6PD enzim aktivitelerine bakılan yaklaşık 800 olgu taranmıştır. Bu olguların G6PD enzim aktiviteleri 4.0 U/grHb ve altında olan 60 olgu çalışmamıza dahil edilmiştir. Olgularda 4 mutasyon tipi taranmış ve 60 olgunun 4'ünde (%6.66) Mediterranean mutasyon bulunmuştur. Mediterranean dışında diğer 3 mutasyona rastlanmamıştır. Bulduğumuz bu sonuç Özmen ve arkadaşlarının %0.25 olan sonuçlarına göre yüksek görülse de olgu seçiminin bizim çalışmamızda daha spesifik olması sonuçlardaki farklılığı açıklamaktadır.

Çalışmamızda 60 olgudan 2'sinde heterozigot ve 2'sinde de hemizigot olmak üzere 4 Mediterranean mutasyonuna rastladık. Bu Akdeniz bölgesi oranlarına yakın bir değer olan %6.66 ya tekabül etmektedir. Mutasyonların biri, annesi ve babası da Erzurum'lu olan ve yeni doğan sarılığı teşhisiyle yatırılan Erzurum doğumlu bir erkek bebekte (olgu 59), diğerleri de Türkiye'nin doğusundan Iğdır'dan bize başvuran bir ailede, iki kız çocuğunda ve babada bulunmuştur (olgu 7,9 ve 20). X geçişli olan mutasyon babadan iki kızına da aktarılmıştır. Babada ve büyük kız çocuğunda hemolitik anemi ile ilgili herhangi bulguya rastlanmamasına rağmen, küçük kız çocuğu doğumda sarılık teşhisiyle hastaneye yatırılmış, yapılan tetkikler sonucunda; total bilirubin çok yüksek, eritrosit sayısı düşük ve hemoglobinde normal sayılabilecek seviyede olmasıyla beraber G6PD enzim aktivite seviyesi de normalin oldukça altında 1 gr/Hb olarak tespit edilmiştir (olgu 7).

Elde edilen bulgular, bulunan mutasyonların Türkiye’de görülen mutasyonlarla özgülük gösterdiğine ve G6PD Akdeniz’in ülkemizde en sık bulunan varyant olduğuna işaret etmektedir.

Hemizigot erkek veya homozigot dişi G6PD yetmezlikli bireylerin tayini, şu an biyokimya laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan spektrofotometrik G6PD aktivite ölçümü ile kolaylıkla yapılmaktadır. Fakat heterozigot G6PD yetmezlikli bireylerin tanısında bazı çelişkiler vardır, bu vakaların en az %61’i normal aktiviteye sahiptir^{56,87}.

Rastgele olan X lyonizasyonu nedeniyle heterozigot dişi bireylerin, normal aktivite gösteren ve aktivite göstermeyen iki farklı hücre popülasyonu bulunmaktadır. Dolayısıyla heterozigot bir bireye yetmezlikli veya normal tanısı konabilmektedir ve bu olgular, mevcut kullanılan testlerle kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Heterozigot G6PD yetmezlikli bayan olguların tanısının konulması için, ilgili gende moleküler analizler yapılmalı ve defektli bölge incelenmelidir. İlerleyen teknoloji DNA testlerini G6PD taramasında kullanabilecek kadar ekonomik hale getirmiştir. Bilinen mutasyonların taranmasında PCR-RFLP yöntemi ile genin ilgili bölgesi çoğaltılarak ve uygun enzim ile kesilerek jel elektroforezde incelenir. Bilinmeyen mutasyonların saptanmasında genin taranması için PCR-SSCP kullanılmaktadır. Bu yöntemle 13 ekson amplifiye edilerek elektroforezde yürütülür ve farklılık gösteren bandlarla mutasyonun yeri belirlenebilir. Bu band daha sonra sekans analizi yapılarak mutasyon tam olarak ortaya konmaktadır⁸⁶.

Bugüne kadar Türkiye’de G6PD mutasyonları PCR-RFLP ve PCR-SSCP yöntemleriyle çalışılmış, fakat oldukça güvenli ve hızlı bir yöntem olan mikroarray sistemiyle SNP analizi yapılmamıştır. Bizim bu yöntemi kullanmadaki amacımız G6PD genindeki mutasyonları moleküler düzeyde genetik olarak incelemek ve bu gen

mutasyonlarının bölgemizdeki dağılımını doğru bir şekilde tespit etmektir. Akdeniz ve Çukurova bölgelerinde daha fazla görülen bu mutasyonların tanısı için mikroarray chip sistemiyle uygulanabilecek bir yöntem geliştirmek, çalışmaları hızlı ve güvenilir bir şekilde sürdürmektir.

Çalışmamızda kullandığımız ve son yıllarda geliştirilen array teknolojisinin otomasyona adapte edilmesiyle rutin analizlerde kullanma imkanı doğmuştur. Nanogen array platformu cam bazlı array'lerden (glass array) farklı olarak kullanıcının tasarımına açık, elektronik array teknolojisine sahip olan ve rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Nanogen SNP analizlerinin yanı sıra gen ekspresyonu analizlerinde ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında güvenilirlikle kullanılan bir teknolojidir. Modifiye edilebilmeye elverişli olması nedeniyle yeni uygulamalarda da kolaylıkla kullanıma açıktır.

Tektaş Southwestern Üniversitesi Tıp Merkezinde ve Mayo Klinikte yapılan karşılaştırmalı araştırmalarda Nanogen'de %100 doğru sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlardan hareketle Nanogen platformunu öne çıkaran özelliği otomasyonla çalışmaya elverişli olması yanında hatalı sonuç vermemesi ve güvenilir olmasıdır⁷⁸⁻⁸⁰.

Bizim çalışmamızdaki sonuçlarla diğer çalışmaların sonuçlarındaki farklılıklar hasta seçim kriterlerine bağlı olabileceği gibi bölgemize spesifik mutasyonlarında olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple çalışmamızın devamında olgularımızın G6PD genlerinde sekans analizi yapılması ve var olabilecek yeni mutasyonların tespiti planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- 1- Persico MG, Viglietto G, Martini G. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14(6): 2511–2522.
- 2- Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L. DNA Sequence Abnormalities of Human Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Variants. *J Biol Chem.* 1991; 266: 4145-4150.
- 3- Scott MD, Zuo L, Lubin BH, Chiu DTY. NADPH, Not Glutathione, Status Modulates Oxidant Sensitivity in Normal and Glucose- 6 -Phosphate Dehydrogenase Deficient Erythrocytes. *Blood.* 1991; 77: 2059-2064
- 4- Beutler E. G6PD deficiency. *Blood.* 1994; 84: 3613-3636.
- 5- Martini G, Ursini MV. A new lease of life for an old enzyme. *Bioessays.* 1996; 18: 631-637.
- 6- Naylor CE, Rowland P, Basak A.K et al. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Mutations Causing Enzyme Deficiency in a Model of the Tertiary Structure of the Human Enzyme. *Blood.* 1996; 87: 2974-2972.
- 7- Büyükokuroğlu ME, Altıkat S, Çiftçi M, Banoğlu ZN, Göçer F. Klorpromazin ve Haloperidol'ün İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnvitro Etkileri. *Klinik Psikiyatri Bülteni.* 2001; 11: 101-105
- 8- Au SW, Gover S, Lam V.M, Adams M.J. Human G-6-PD: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure Fold.* 2000; 8: 293-303

- 9- Pietrapetrosa A, Palma A, Campanale D, Delios G, Vitucci A, Tannoia N. Genotype and phenotype correlation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Haematologica*. 2001; 86: 30-35
- 10- Karadsheh NS, Moses L, Ismail SI, Devaney JM, Hoffman E. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Jordan. *Haematologica*. 2005; 90: 1693-1694
- 11- Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus. *Semin Neonatol*. 2002; 7(2): 121-128.
- 12- Köksal N. Hemolitik Anemi. *Türkiye Klinikleri J. Ped*. 2004; 2: 747-753
- 13- Vulliamy TJ, Urso MD, Battistuzzi G. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1988; 85: 5171-5175.
- 14- Poggi V, Town M, Foulkes NS, Luzzatto L. Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem. J*. 1990; 271: 157-160
- 15- Cappellini MD, Montemuros FM, Bellis GD, Debernardi S, Dotti C, Fiorelli G. Multiple G6PD Mutations Are Associated With a Clinical and Biochemical Phenotype Similar to That of G6PD Mediterranean. *Blood*. 1996; 87(9): 3953-3958.
- 16- “<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>” Human Gene Mutation Database (HGMD). 30.08.2007.

- 17- Aksoy M, Dincol G, Erdem S. Survey on haemoglobin variants, beta-thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and haptoglobin types in Turkish people living in Manavgat, Serik and Boztepe (Antalya). *Hum Hered.* 1980; 30(1): 3-6.
- 18- Aksoy K, Yuregir GT, Dikmen N, Unlukurt I. Three new G6PD variants, G6PD Adana, G6PD Samandag, and G6PD Balcali in Cukurova, Turkey. *Hum Genet.* 1987; 76(2): 199-201.
- 19- Yalın S, Yalın E, Ünlükurt İ, Aksoy K. Çukurova Bölgesinde saptanan G6PD varyantlarının kinetik özellikleri. *Türk Biokimya Dergisi.* 2001; 26: 83-89
- 20- Oski FA, Brugnara C, Nathan DG. A Diagnostic Approach to the Anemic Patient. In: Nathan DG and Orkin SH eds. *Nathan and Orki's hematology of infancy and childhood.* 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999: 377.
- 21- Öngören Ş. Hemolitik Anemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. *Anemiler Sempozyumu.* 2001; 49-60
- 22- Özmen İ. Erzurum yöresinde yaşayan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği tespit edilen şahıslarda glukoz 6-fosfat dehidrogenaz kinetiğinin incelenmesi ve mutasyon noktalarının moleküler tekniklerle taranması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD. Doktora Tezi, Erzurum, 2002.
- 23- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* University of Wisconsin – Madison. 2005; 551-557.
- 24- Özmen İ, Küfrevioğlu Oİ, Gül M. Effects of some antibiotics on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes in vitro and effect of isepamicin sulfate on activities of antioxidant enzymes in rat erythrocytes. *Drug Chem Toxicol.* 2005; 28: 433-445.

- 25- Izawa S, Maeda K, Miki T, Mano J, Inoue Y, Kimura A. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 1998; 330: 811-817.
- 26- Kondo T., Dale O.L., Beutler E.: Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. Biochem.* 1980; 77: 6359–6362.
- 27- Bilmen S, Aksu TA, Gumuslu S, Korgun DK, Canatan D. Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 2001; 303: 83-86.
- 28- Çiftci M, Özmen İ, Buyukokuroglu ME, Pence S, Kufrevioglu OI. Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo. *Clin Biochem.* 2001; 34(4): 297-302
- 29- Özmen İ, Kufrevioglu OI. Effects of antiemetic drugs on glucose 6-phosphate dehydrogenase and some antioxidant enzymes. *Pharmacol Res.* 2004; 50(5): 499-504.
- 30- Szweda LI, Stadtman ER. Iron-catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Structural and functional changes. *J Biol Chem.* 1992; 267(5): 3096-3100.
- 31- Morelli A, Grasso M, Meloni T, Forteleoni G, Zocchi E, De Flora A. Favism: impairment of proteolytic systems in red blood cells. *Blood.* 1987; 69(6):1753-1758.
- 32- Turrini F, Naitana A, Mannuzzu L, Pescarmona G, Arese P. Increased red cell calcium, decreased calcium adenosine triphosphatase, and altered membrane proteins during fava bean hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (Mediterranean variant) individuals. *Blood.* 1985; 66(2): 302-305.
- 33- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819-1828.

- 34- Özkan A. Eritrosit Enzim Eksiklikler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Anemiler Sempozyumu. 2001; 143-148
- 35- Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemolytic anemia. In: Nathan DG , Orkin SH , eds. Nathan and Orki's hematology of infancy and childhood. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999: 704-726.
- 36- Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT. et al. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood*. 1999; 94(9): 2955-2962.
- 37- Au WY, Ma SK, Lie AK, Liang R, Cheng T, Kwong YL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29(5): 399-402.
- 38- Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L. Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet*. 1995; 56(1): 294-301.
- 39- Reglinski J, Hoey J, Simith W, Sturrock RD. Cellular response to oxidative stress at sulfhydryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem*. 1988; 263: 12360- 12366.
- 40- Meloni T, Forteleoni G, Dore A, Cuttillo S. Favism and hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient subjects in North Sardinia. *Acta Haematol*. 1983; 70(2): 83-90.
- 41- De Flora A, Benatti U, Guida L, Forteleoni G, Meloni T. Favism: disordered erythrocyte calcium homeostasis. *Blood*. 1985; 66(2): 294-297.

- 42- McMillan DC, Bolchoz LJ, Jollow DJ. Favism: effect of divicine on rat erythrocyte sulfhydryl status, hexose monophosphate shunt activity, morphology, and membrane skeletal proteins. *Toxicol Sci.* 2001; 62(2): 353-359.
- 43- Gaskin RS, Estwick D, Peddi R. G6PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethn Dis.* 2001; 11(4): 749-54.
- 44- Abid S, Khan AH. Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(6): 1544-1547.
- 45- Gerrah R, Shargal Y, Elami A. Impaired oxygenation and increased hemolysis after cardiopulmonary bypass in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76(2): 523-527.
- 46- Battistuzzi G, D'Urso M, Toniolo D, Persico GM, Luzzatto L. Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82(5): 1465-1469.
- 47- Rovira A, De Angioletti M, Camacho-Vanegas O et al. Stable in vivo expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and rescue of G6PD deficiency in stem cells by gene transfer. *Blood.* 2000; 96(13): 4111-4117.
- 48- De Angioletti M, Rovira A, Notaro R, Camacho Vanegas O, Sadelain M, Luzzatto L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase expression is less prone to variegation when driven by its own promoter. *Gene.* 2001; 267(2): 221-231.
- 49- Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(12): 4157-4161.

- 50- Martini G, Toniolo D, Vulliamy T et al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J.* 1986; 5(8): 1849-1855.
- 51- Chen EY, Cheng A, Lee A et al. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. *Genomics.* 1991; 10(3): 792-800.
- 52- Hirono A and Beutler E. Alternative splicing of human glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA in different tissues. *J Clin Invest.* 1989; 83(1): 343-346.
- 53- Hirono A, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, Fairbanks VF, Beutler E. Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(24): 10015-10017.
- 54- “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=31542>” Omim no; X03674. 30.08.2007.
- 55- Yan T, Cai R, Mo O, Zhu D et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations. *Haematologica.* 2006; 91(10): 1321-1328.
- 56- Gürbüz N. Glukoz –6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Yetmezliğinde Heterozigot Vakaların Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü ve G6PD Boyanması tekniği ile Değerlendirilmesi. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD. Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 2003.
- 57- Hansen RS, Canfield TK, Fjeld AD, Gartler SM. Role of late replication timing in the silencing of X-linked genes. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(9): 1345-1353.

- 58- Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med.* 2007; 4(3): 516 - 522.
- 59- Ginsburg H, Golenser J. Redox metabolism in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes and its relation to antimalarial chemotherapy. *Parassitologia.* 1999; 41(1-3): 309-311.
- 60- Saunders MA, Hammer MF, Nachman MW. Nucleotide variability at G6pd and the signature of malarial selection in humans. *Genetics.* 2002;162(4): 1849-1861.
- 61- Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N et al. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science.* 2001; 293: 455 - 462.
- 62- Yoshida A, Takizawa T, Prchal JT. RFLP of the X chromosome-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase locus in blacks. *Am J Hum Genet.* 1988; 42(6): 872-876.
- 63- "Standardization of procedure for G6PD deficiency" Report of WHO scientific group. WHO technical report series. Sr. no 366. 1967
- 64- Vives-Corrons JL, Kuhl W, Pujades MA, Beutler E. Molecular genetics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Mediterranean variant and description of a new G6PD mutant, G6PD Andalus1361A. *Am J Hum Genet.* 1990; 47(3): 575-579.
- 65- Kurdi-Haidar B, Mason PJ, Berrebi A, Ankra-Badu G, al-Ali A, Oppenheim A, Luzzatto L. Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. *Am J Hum Genet.* 1990; 47(6): 1013-1019.
- 66- Vulliamy TJ, Wanachiwanawin W, Mason PJ, Luzzatto L. G6PD mahidol, a common deficient variant in South East Asia is caused by a (163)glycine-> serine mutation. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(14): 58-68.

- 67- Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 28(2): 93-103.
- 68- Martinez di Montemuros F, Dotti C, Tavazzi D, Fiorelli G, Cappellini MD. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Italy. *Haematologica.* 1997; 82(4): 440-445.
- 69- Ozmen I, Ciftci M, Kufrevioglu OI, Curuk MA. Investigation of the mutation points and effects of some drugs on glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient people in the Erzurum region. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004; 19(4): 355-360.
- 70- Tabata M, Kido T, Totani M, Murachi T. Direct spectrophotometry of magnesium in serum after reaction with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Clin Chem.* 1985; 31(5): 703-705.
- 71- Ciftci M, Senyayla F, Ozdemir H, Buyukokuroglu ME. Some drug effects on the activity of erythrocyte hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase enzymes in vitro and in vivo. *Pol J Pharmacol.* 2002; 54(6): 673-679.
- 72- Altikat S, Ciftci M, Buyukokuroglu ME. In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Pol J Pharmacol.* 2002; 54(1): 67-71.
- 73- Gurbuz N, Aksu TA, Van Noorden CJ. Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Histochem.* 2005; 107(4): 261-267.
- 74- Noori-Dalooi MR, Najafi L, Mohammad Ganji S, Hajebrahim Z, Sanati MH. Molecular identification of mutations in G6PD gene in patients with favism in Iran. *J Physiol Biochem.* 2004; 60(4): 273-277.

- 75- Beutler E, Westwood B, Melemed A, Dal Borgo P, Margolis D. Three new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *Blood Cells Mol Dis.* 1995; 21: 64-72.
- 76- Menounos P, Zervas C, Garinis G, Doukas C, Kolokithopoulos D, Tegos C, Patrinos GP. Molecular heterogeneity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Hellenic population. *Hum Hered.* 2000; 50(4): 237-241.
- 77- Menounos PG, Garinis GA, Patrinos GP. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency does not result from mutations in the promoter region of the G6PD gene. *J Clin Lab Anal.* 2003;17(3): 90-92.
- 78- Nanogen 1999 Annual Report. 1999; 5-6.
- 79- Edman CF, Mehta P, Press R, Spargo CA, Walker GT, Nerenberg M. Pathogen analysis and genetic predisposition testing using microelectronic arrays and isothermal amplification. *J Investig Med.* 2000; 48(2): 93-101.
- 80- Thistlethwaite WA, Moses LM, Hoffbuhr KC, Devaney JM, Hoffman EP. Rapid Genotyping of Common MeCP2 Mutations with an Electronic DNA Microchip Using Serial Differential Hybridization. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2003; 5(2): 121-126.
- 81- Moutereau S, Narwa R, Matheron C, Vongmany N, Simon E, Goossens M. An improved electronic microarray-based diagnostic assay for identification of MEFV mutations. *Hum Mutat.* 2004; 23(6): 621-628.
- 82- Frigerio R, Sole G, Lovicu M, Passiu G. Molecular and biochemical data on some glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from southern Sardinia. *Haematologica.* 1994; 79(4): 319-321.

- 83- Beutler E, Westwood B, Prchal JT, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L. New glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations from various ethnic groups. *Blood*. 1992; 80(1): 255-256.
- 84- Tüli A. Adana ve yöresinde G6PD yetmezliği. Uzmanlık tezi. Adana.1994
- 85- Açıkbaş İ. Antalya yöresinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliğinin genetiği üzerine araştırmalar. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD. Doktora Tezi, Antalya, 1999.
- 86- Keskin N, Ozdes I, Keskin A, Acikbas I, Bagci H. Incidence and molecular analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the province of Denizli, Turkey. *Med Sci Monit*. 2002; 8(6): 453-456.
- 87- Wolf BH, Weening RS, Schutgens RB, van Noorden CJ, Vogels IM, Nagelkerke NJ. Detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes: a spectrophotometric assay and a fluorescent spot test compared with a cytochemical method. *Clin Chim Acta*. 1987; 168(2): 129-136.